

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDILEUSA CRISTINA MARQUES GERHARDT

IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS PII E
PROTEÍNAS ALVO

CURITIBA
2015

EDILEUSA CRISTINA MARQUES GERHARDT

IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS PII E
PROTEÍNAS ALVO


Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutora pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências- Bioquímica, do
Setor de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo

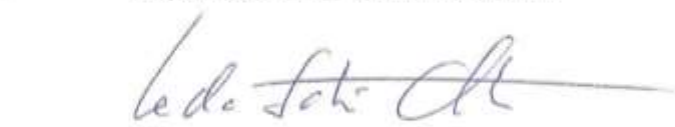
CURITIBA
2015

TERMO DE APROVAÇÃO**EDILEUSA CRISTINA MARQUES GERHARDT****IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO *IN VITRO* DA INTERAÇÃO ENTRE PROTEÍNAS
PII E PROTEÍNAS ALVO**


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



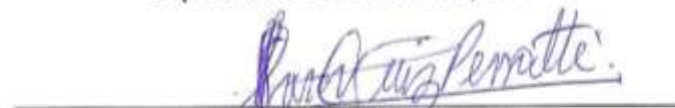
Prof. Dr. Luciano Fernandes Huérigo – Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR



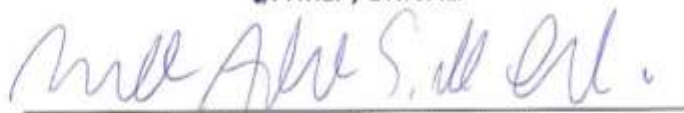
Prof.ª Dr.ª Leda Satie Chubatsu
Departamento de Bioquímica, UFPR



Prof.ª Dr.ª Ana Claudia Bonatto
Departamento de Genética, UFPR



Prof. Dr. Marcos Luiz Pessatti
CTTMar, UNIVALI



Prof. Dr. Marco Aurélio Shuler de Oliveira
Departamento de Bioquímica, UEM

Curitiba, 09 de novembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, por me dar forças para continuar sempre.

Agradeço ao Dr. Luciano F. Huergo, por ter aceitado me orientar no mestrado e por continuar a me orientar no doutorado. Agradeço pela orientação, pela paciência, pelo tempo dedicado a mim, por toda sua disposição e tempo para discussões e, principalmente, pelo exemplo de pesquisador. Eu não poderia ter tido um orientador melhor!

Ao Dr. Karl Forchhammer, por me receber em seu laboratório e me orientar durante o tempo que permaneci em seu laboratório. Obrigada pelo incentivo, pela atenção e pelo carinho durante minha estadia na Alemanha.

Ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza, por me receber inicialmente no grupo e me incentivar, quando o mestrado era ainda apenas uma possibilidade.

À Dr^a. Leda Chubatsu, pela atenção e por toda a ajuda durante esses anos, mas também por aceitar corrigir meus relatórios, e avaliar minha tese. Suas avaliações contribuíram para tornar esse trabalho melhor.

Ao Dr. Marcos Luiz Pessatti, por suas excelentes aulas, que fizeram com que eu me apaixonasse pela bioquímica. Por ser meu primeiro modelo e, principalmente, pelo carinho e amizade.

Ao Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira, por toda a ajuda (sempre), por sua disposição e atenção. E muito obrigada por aceitar fazer parte da banca de avaliação desse trabalho.

À Dr^a. Ana Claudia Bonatto, por aceitar fazer parte da avaliação da minha tese.

Ao Dr. David Mitchel, por todo o tempo dedicado às correções do meu trabalho.

A todos os professores e demais integrantes do Núcleo de fixação de Nitrogênio pela ajuda, discussões, dicas, e convívio.

À Dr^a. Vivian Moure, ao Ms. Thiago Rodrigues, e aos alunos de iniciação científica Andrey Wesley e Marcela Verginia de Medeiros, por toda a ajuda nos experimentos no decorrer desses anos.

Aos amigos da 271 e 272 (e agregados) pelo ótimo convívio, por tornarem o ambiente de trabalho um local agradável para se estar. Obrigada também por toda a ajuda durante o meu doutorado.

Aos colegas do laboratório de Tübingen, por me receberem tão bem e por toda a ajuda na adaptação e no decorrer do meu tempo lá, em especial ao Jan Lüddecke, por sua disposição e atenção, e por me ajudar em tudo que precisei no laboratório.

À coordenação do curso de pós-graduação em bioquímica e aos professores do departamento Bioquímica. A CAPES, ao CNPq, ao programa PRONEX, a FUNPAR e ao INCT pelo suporte financeiro.

Aos técnicos do Núcleo de Fixação de Nitrogênio Valter de Baura e Roseli Prado e a Christina Herrmann (Tübingen) por toda a ajuda oferecida no decorrer da minha tese.

Ao meu marido, Roberto Drebes Gerhardt, por ser meu porto seguro, por me apoiar nos meus sonhos e por me amar. Por ser uma constante na minha vida e me ajudar a ser uma pessoa melhor.

À minha mãe Neuza Castro Marques por sua fé incondicional em mim e por seu amor infinito. Por ser um modelo de mãe e de mulher.

Às minhas irmãs Edilaine C. Marques e Eduarda C. Marques, por todo o amor, carinho, fé em mim e por serem (junto com minha mãe e Beto) os alicerces da minha vida. Vocês são o que há de mais importante na minha vida.

Ao meu pai Edison Marques (em memória), por seu amor incondicional.

À toda minha família, simplesmente por existirem, mas também por todo o amor e apoio.

Aos amigos (do lab ou de toda a vida). Agradeço em especial à Heloisa B. Soligo Sanchuki e ao Carlos Eduardo Sanchuki, por serem família. Às queridas Luluzinhas e às Florzinhas, por fazerem meus dias mais felizes. Aos amigos da vida toda Paulo, Amanda, Joyce, Camila e tantos outros, que mesmo longe são essenciais. E aos amigos de Tübingen, mas em especial à Rebeca, Katja e Amit, por serem minha família longe de casa, por fazerem meu tempo em Tübingen especial e inesquecível.

RESUMO

As proteínas PII são proteínas transdutoras de sinais, ubíquas em bactérias. Elas estão envolvidas com a regulação do metabolismo de nitrogênio e atuam principalmente por interação direta com proteínas alvo em resposta a ligação dos efetores ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG). A ligação de efetores por PII acarreta em alterações conformacionais que refletem diretamente na interação de PII com proteínas alvo. Em *Azospirillum brasilense* existem duas proteínas PII denominadas GlnB e GlnZ, relacionadas com a ativação transcricional de genes do metabolismo de nitrogênio e regulação pós traducional da nitrogenase em resposta a alteração dos níveis celulares de amônio e 2-OG. Visto que proteínas PII têm a capacidade de sensoriar 2-OG, um metabólito diretamente relacionado ao nível de carbono e nitrogênio celular, é possível que proteínas PII possam desempenhar um papel regulatório no metabolismo de carbono, porém essa hipótese ainda não foi confirmada. Como a atuação de proteínas PII se dá principalmente por interação proteína-proteína, o objetivo deste trabalho foi detectar novas proteínas ligantes das proteínas PII em *A. brasilense*, para melhor compreender o papel de PII no metabolismo deste organismo. Foram realizados ensaios de interação entre a proteína GlnZ com cauda 6xHis imobilizada em coluna de afinidade e extratos proteicos de *A. brasilense* 2812 (*glnB/glnZ*), com variação dos efetores ADP, ATP e 2-OG para interação e eluição das proteínas. As proteínas obtidas foram analisadas por espectrometria de massa e classificadas em grupos funcionais. Dentre as proteínas identificadas destacou-se a proteína BCCP (componente da enzima acetil-CoA carboxilase – ACC) por já ter sido descrita por interagir com PII em *Arabidopsis thaliana*. O gene *accB* (BCCP) foi clonado do genoma de *A. brasilense* FP2 e ensaios *in vitro* foram realizados para caracterização do complexo PII-BCCP. Foram realizados ensaios de atividade com a enzima ACC de *Escherichia coli* (EcACC) e com proteínas PII de *E. coli* (EcGlnB), *A. brasilense* (AbGlnB) e *Synechococcus elongatus* (SeGlnB) para verificação do efeito de PII na atividade de ACC. Os dados obtidos sugerem uma função conservada de GlnB na regulação da biossíntese de ácidos graxos através de inibição de ACC, uma vez que as proteínas GlnB diferentes organismos foram capazes de inibir a enzima EcACC. O efeito inibitório de EcGlnB e AbGlnB sobre EcACC foi afetado por altas concentrações de 2-OG e por uridililação de PII. Esses dados, juntamente com a análise de variantes de GlnB, sugerem a participação do *loop* T de GlnB na interação GlnB-ACC. O modelo proposto para a inibição de ACC por GlnB sugere que isso ocorra em baixos níveis de carbono e altos níveis de nitrogênio, quando a concentração de 2-OG é baixa. Além de BCCP, algumas proteínas encontradas nos ensaios de interação têm alta probabilidade de serem alvos de PII. Dentre elas, outras proteínas do metabolismo de ácidos graxos, e proteínas envolvidas com vias metabólicas diversas, como NAD⁺ sintetase, proteínas do sistema PTS, Glutamato sintase, RelA e RNases. Os resultados obtidos indicam que em *A. brasilense* as proteínas PII podem estar atuando na regulação de processo metabólicos diversos.

Palavras chave: proteínas PII; 2-oxoglutarato; interação proteína-proteína; acetil-CoA carboxilase

ABSTRACT

PII proteins are signal transducer proteins, ubiquitous in bacteria. They are involved in nitrogen metabolism regulation and act mostly by direct protein-protein interaction in response to effector binding of ATP, ADP and/or 2-oxoglutarate (2-OG). Effectors binding by PII cause conformational changes, which reflect directly on PII interaction with target proteins. In *Azospirillum brasilense* there are two PII proteins named GlnB and GlnZ, involved with transcriptional activation of nitrogen metabolism genes and nitrogenase post-translational regulation in response to variation of ammonium and 2-OG cellular levels. Since PII proteins are able of sensing 2-OG, which is directly involved with carbon and nitrogen cellular levels signaling, a role in carbon metabolism by PII proteins have been addressed. As PII act by protein-protein interaction, in this study protein interaction assays were performed using a His-tagged GlnZ fusion immobilized on a Ni²⁺-bound resin and a crude extract of *A. brasilense* strain 2812 (*glnB-/glnZ-*), using different levels of the effectors ADP, ATP and 2-OG. Protein that were retained by this affinity chromatography were identified by mass spectrometry and classified into functional groups. One of the identified proteins was BCCP protein (component of acetyl-CoA carboxylase or ACC) which interaction with PII has been described earlier in *Arabidopsis thaliana*. The *accB* gene (coding for BCCP) was cloned from *A. brasilense* FP2 genome allowing *in vitro* assays to be performed in order to characterize PII-BCCP interaction. Enzymatic assays with *Escherichia coli* ACC and PII proteins from *E. coli*, *A. brasilense* and *Synechococcus elongatus* were carried out to determine the effect of PII on ACC activity. Our data suggested a conserved role of GlnB regulating fatty acids biosynthesis by inhibiting ACC, since GlnB protein from *E. coli*, *A. brasilense*, *S. elongatus* and *A. thaliana* produced an inhibitory effect on the acetyl-CoA carboxylase activity. 2-OG levels and the uridylylated state of PII affected the inhibitory effect of EcGlnB and AbGlnB on EcACC. These results and assays using GlnB variants suggest involvement of GlnB T loop in the GlnB-ACC interaction. The proposed model for the inhibition of ACC by GlnB suggests that it occurs in low carbon and high nitrogen levels, when the concentration of 2-OG is low. Besides BCCP, some proteins found in interaction assays have a high probability of being the targets of PII. Among these, other proteins from fatty acids metabolism, and proteins involved in various metabolic pathways, like NAD⁺ synthetase, PTS system proteins, glutamate synthase, RelA and RNases. The results indicate that in *A. brasilense* PII proteins can act in the regulation of many metabolic processes.

Key words: PII protein; 2-OG; protein-protein interaction; acetyl-CoA carboxylase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da estrutura do trímero de GlnZ de <i>A. brasilense</i> .	15
Figura 2 – Representação da ocupação dos sítios de PII pelos efetores ATP, ADP e 2-OG.	17
Figura 3 - Via GS/GOGAT de assimilação de amônio.	18
Figura 4 - Esquema da estrutura de ACC.	27
Figura 5 – Acetil-CoA carboxilase em diferentes organismos.	28
Figura 6 – Estrutura de BCCP de <i>E. coli</i> .	30
Figura 7 - Alinhamento de BCPP de <i>Escherichia coli</i> , <i>Synechococcus elongatus</i> , <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Myxococcus xanthus</i> .	31
Figura 8 - Estrutura de BC e BC-BCCP de <i>E. coli</i> .	33
Figura 9 – Estrutura da Carboxiltransferase (CT).	35
Figura 10 – Regulação da síntese de ácidos graxos de vertebrados.	36
Figura 11 - Construção do plasmídeo pEGPet29GlnZ-FLAG.	49
Figura 12 - Construção do plasmídeo pEGPETGlnB.	51
Figura 13 - Esquema do ensaio de interação de His-GlnZ com o extrato de <i>A. brasilense</i> 2812.	56
Figura 14 – Esquema do ensaio de interação utilizando resina magnética anti-FLAG M2.	58
Figura 15 - Ensaio de interação de His-GlnZ com extrato de <i>A. brasilense</i> 2812.	69
Figura 16 - Ensaio de interação de His-GlnZ com extrato de <i>A. brasilense</i> 2812.	79
Figura 17 - Comparação das resinas das colunas HiTrap Chelating HP e Protino Ni-IDA.	81
Figura 18 - Ensaio de interação de GlnZ com extrato de <i>A. brasilense</i> 2812 utilizando diferentes colunas cromatográficas.	82
Figura 19 – Distribuição das proteínas identificadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS.	85
Figura 20 – Metabolismo de ácidos graxos.	88
Figura 21 –Esquema da biossíntese de arginina para NAGK dimérica (a esquerda) e hexamérica (a direita).	94
Figura 22 - Via de síntese de poliaminas e degradação de putrescina em <i>E. coli</i> .	95
Figura 23 – Sistema paralelo de fosfotransferase em bactérias.	99
Figura 24 – Papel de RelA na resposta estrigente em <i>E. coli</i> em baixo nitrogênio.	102
Figura 25 - Comparação da degradação de mRNA e RNA estável e maturação de RNA em <i>E. coli</i> .	103
Figura 26 - Perfil eletroforético das frações obtidas durante a purificação de AbBCCP-His.	106
Figura 27 – Avaliação de diferentes resinas para purificação da proteína AbBCCP.	107
Figura 28 - Perfil eletroforético das frações obtidas na purificação de AbBCCP nativa.	109
Figura 29 - Perfil obtido para proteína AbBCCP His em análise por MALDI-TOF.	110
Figura 30 – Reação catalisada pela enzima Acetil-CoA carboxilase.	113
Figura 31 -Efeito de diferentes PII na atividade de ACC de <i>E. coli</i> .	115
Figura 32 – Efeito de diferentes concentrações de PII na atividade de ACC de <i>E. coli</i> . (A)	116
Figura 33 - Efeito de 2-oxogutarato (2-OG) na inibição de ACC por PII.	117
Figura 34 – Efeito de GlnB nos parâmetros cinéticos de ACC.	119
Figura 35 – Uridililação de GlnB afeta negativamente a interação com ACC.	120
Figura 36 – Efeito de variantes de AbGlnB e AbGlnZ na atividade de <i>E. coli</i> ACC.	122
Figura 37 – Efeito de mutações pontuais em SeGlnB na interação com ACC.	125
Figura 38 – Efeito de diferentes concentrações de 2-OG no efeito inibitório de SeGlnB sobre EcACC.	125
Figura 39 – Comparação da estrutura de SeGlnB e SeGlnB I86N.	131
Figura 40 – Modelo da Regulação de ACC por GlnB.	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas que interagem com proteínas PII	25
Tabela 2 - Estirpes de bactérias e plasmídeos.....	43
Tabela 3 - Preparo do tampão termal de reação 5X.....	50
Tabela 4 - Preparo do Master Mix para reação de Gibson	50
Tabela 5 – Ensaios de interação entre AbGlnZ e extrato de Ab2812	67
Tabela 6 - Proteínas diferenciais do ensaio de interação de His-GlnZ e extrato de <i>A. brasilense</i> 2812 analisadas por MALDI-TOF.	70
Tabela 7 – Compilação das proteínas identificadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS e MALDI-TOF	71
Tabela 8 - Proteínas diferenciais identificadas por MALDI-TOF no ensaio EI3	83

LISTA DE ABREVIATURAS

2-OG	2-oxoglutarato
ACC	Acetil-CoA Carboxilase
ADP	5' difosfato de adenosina
Amp ^r	resistência a ampicilina
AMP	5' monofosfato de adenosina
AR	Função removedora de adenilil (ATase)
AT	Função de adenilação (ATase)
ATase	enzima adenililtransferase
ATP	5' trifosfato de adenosina
BC	Biotina carboxilase
BCCP	Proteína carreadora de carboxi biotina
BSA	Albumina bovina
Cm ^r	resistência a cloranfenicol
CoA	Coenzima A
CT	Carboxiltransferase
DLS	Espalhamento dinâmico de luz (do inglês <i>Dynamic light scattering</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	5' trifosfato de 2' desoxinucleotídeo
DraG	dinitrogenase redutase glicohidrolase
DO ₆₀₀	densidade óptica a 600 nm
DraT	dinitrogenase ADP-ribosil transferase
DTT	ditiotreitól
E _{Ct}	Fração: Eluição específica na condição controle
E _{GlnZ}	Fração: Eluição específica na condição GlnZ
EI1	Ensaio de interação 1 - ATP/ATP+2-OG
EI2	Ensaio de interação 2 - ADP/ATP+2-OG
EI3 ₁	Ensaio de interação 3 - ATP/ATP+2-OG - coluna HiTrap <i>Chelating</i>
EI3 ₂	Ensaio de interação 3 - ATP/ATP+2-OG - coluna Protino Ni-IDA
EI3 ₃	Ensaio de interação 3 - ATP/ATP+2-OG - resina magnética Anti-FLAG
GlnB-UMP	proteína GlnB uridililada
GlnZ-UMP	proteína GlnZ uridililada
GOGAT	glutamato sintase
GS	glutamina sintetase
HPR	horseradish peroxidase
IPTG	β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
Km ^r	resistência a canamicina
LC/MS	cromatografia líquida acoplada a espectrometria de

	massa
LDH	Lactato desidrogenase
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption</i>
m/v	massa por volume
NAGK	Acetilglutamato quinase
NAD ⁺	nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo reduzido
NaI ^r	resistência a ácido nalidíxico
NtrC-P	proteína NtrC fosforilada
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDH	complexo piruvato desidrogenase
PEG	Polietilenoglicol
PHB	Polihidroxibutirato
Pi	fosfato inorgânico
PK	Piruvato quinase
ppGpp	guanosina tetrafosfato
PTS	Sistema de fosfotransferases
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
RNA	ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease
rpm	rotação por minuto
RT	Tempo de retenção
SDS	dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	dodecilsulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida
Sm ^r	resistência a estreptomicina
TBS-T	Tris-salina tamponao e Tween 20
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TGA	Triacilglicerol
U	Unidade enzimática
UMP	5' monofosfato de uracila
UR	removedora de uridilil
Utase	enzima uridililtransferase
UV	ultravioleta
v/v	volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Proteínas PII	14
1.2. Resposta de PII a efetores	16
1.3. Funções de PII	22
1.4. Identificação de novas proteínas capazes de interagir com PII	24
1.5. Acetil-CoA carboxilase	26
1.6. Subunidade Proteína carreadora de carboxi-biotina (BCCP)	29
1.7. Subunidade Biotina Carboxilase	32
1.8. Subunidade Carboxiltransferase	34
1.9. Função e regulação de Acetil-CoA Carboxilase	35
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. METODOLOGIA	43
4.1. Bactérias e Plasmídeos	43
4.2. Meios de Cultura	45
4.3. Antibióticos	46
4.4. Transformação Bacteriana	46
4.4.1. Por choque térmico	46
4.4.2. Por eletroporação	47
4.5. Amplificação de DNA através de PCR	48
4.6. Construção do plasmídeo pEGPet29GlnZ-FLAG	48
4.7. Construção do plasmídeo pEGPETGlnB	51
4.8. Construção dos plasmídeos pASK-IBASeGlnB49E, pASK-IBASeGlnB51A e pASK-IBASeGlnB54A	51
4.9. Eletroforese e purificação de fragmentos de DNA	52
4.10. Purificação de DNA plasmidial	52
4.11. Dosagem de proteína	53
4.12. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes	53
4.13. Expressão das proteínas His-Glnz, His-GlnB e GlnZ-FLAG	54
4.14. Ensaio de interação de AbGlnz-His com extrato de <i>A. brasilense</i> 2812	54
4.15. Ensaio de interação de AbGlnZ-FLAG com extrato de <i>A. brasilense</i> 2812	57
4.16. <i>Western blot</i> de proteínas biotiniladas	59
4.17. Identificação de proteínas por MALDI-TOF/MS	60
4.18. Identificação e quantificação de proteínas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS	60
4.19. Purificação da proteína BCCP <i>A. brasilense</i>	62
4.19.1. Expressão das proteínas His-BCCP e BCCP nativa de <i>A. brasilense</i>	62
4.19.2. Purificação de AbBCCP-His	62
4.19.3. Purificação de AbBCCP nativa	63

4.20.	Expressão das proteínas EcBC-His, EcCT-His, EcBCCP, EcBirA, AbBCCP, AbBCCP-His, HsGlnD e PII	64
4.21.	Purificação das proteínas BirA-His, BC-His e CT-His de <i>E. coli</i> e GlnD-His de <i>H. seropedicae</i>	64
4.22.	Purificação da proteína BCCP de <i>E. coli</i>	64
4.23.	Purificação das proteínas PII de <i>A. brasilense</i> e <i>E. coli</i>	65
4.24.	Purificação das proteínas PII (nativa e mutantes) de <i>S. elongatus</i>	65
4.25.	Uridililação das proteínas PII.....	65
4.26.	Ensaio de atividade de ACCase <i>in vitro</i>	66
5.	RESULTADOS.....	67
5.1.	Ensaio de interação <i>in vitro</i> de His-GlnZ com extrato de <i>A. brasilense</i> 2812.....	67
5.1.1.	Ensaio 1 (EI1) - Ensaio de interação de His-GlnZ e extrato de Ab2812 na presença de ATP e eluição com ATP e 2-OG	68
5.1.2.	Ensaio 2 (EI2) - Ensaio de interação na presença de ADP e eluição com ATP e 2-OG.....	78
5.1.3.	Ensaio 3 (EI3) - Ensaio de interação na presença de ATP e eluição com ATP e 2-OG utilizando diferentes resinas	80
5.2.	Análise das proteínas identificadas como possíveis alvos de GlnZ	84
5.3.	Validação das proteínas obtidas nos ensaios de interação	105
5.3.1.	Ensaio de validação da interação entre as proteínas AbBCCP e GlnZ	105
5.4.	Estabelecimento de um protocolo para medir a atividade de ACC <i>in vitro</i>	112
5.5.	Efeito de diferentes proteínas PII na atividade de ACC	114
5.6.	Efeito de 2-OG na interação de GlnB e ACC	116
5.7.	Efeito de GlnB nos parâmetros cinéticos de ACC.....	118
5.8.	Efeito da uridililação de GlnB na atividade de ACC	119
5.1.	Efeito de formas variantes de AbPII na atividade de EcACC.....	121
5.2.	Efeito de variantes da proteína SeGlnB na inibição da atividade de ACC	122
6.	DISCUSSÃO.....	126
7.	CONCLUSÕES.....	136
8.	REFERÊNCIAS	137

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteínas PII

As proteínas da família PII desempenham um importante papel na coordenação da regulação de processos metabólicos centrais. Elas são amplamente distribuídas em Bacteria, Archaea e cloroplastos de algas e plantas de uma forma muito conservada, estando envolvidas na regulação do metabolismo de nitrogênio. As proteínas PII são transdutoras de sinais de carbono, nitrogênio e energia, que, na célula, correspondem à concentração de 2-oxoglutarato (2-OG), glutamina e ATP/ADP, respectivamente, sendo que 2-OG pode sinalizar tanto o estado de carbono quanto de nitrogênio na célula. As interações das proteínas do tipo PII com suas moléculas alvo respondem e dependem da variação da concentração destas moléculas (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001; HUERGO *et al.*, 2012; HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013).

Proteínas da família PII foram classificadas por Arcondéguy e colaboradores (2001) em 3 grupos: GlnB, GlnK e Nifl, de acordo com seu contexto genético. GlnB: associada no contexto genômico ao gene *glnA* que codifica a enzima glutamina sintetase (GS); GlnK: associada geneticamente ao gene *amtB*; Nifl: proteína PII-like relacionada aos genes estruturais da nitrogenase (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013). Além dessas 3 classes, foi adicionado um grupo não caracterizado denominado PII New Group (PII-NG). A presença de proteínas PII é quase universal em procariotos, não sendo encontradas apenas em alguns organismos patogênicos que passaram por um processo evolutivo de redução genômica (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013).

As proteínas PII mais estudadas são as proteínas GlnB e GlnK, codificadas pelos genes *glnB* e *glnK*, respectivamente (ARCONDÉGUY *et al.*, 2001). Estes genes foram inicialmente descritos em *Escherichia coli* por Son e Rhee (1987) e por van Heeswijk *et al.*, (1996). Em *Azospirillum brasilense* (organismo modelo deste trabalho) foram descritas duas proteínas PII, denominadas GlnB (DE ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990) e GlnZ (ortóloga de GlnK) (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996). A proteína GlnB é codificada pelo gene *glnB* e em *A. brasilense* é sintetizada

em altos níveis sob condições limitantes de nitrogênio e em baixos níveis sob condições de excesso de nitrogênio (DE ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990; DE ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993; HUERGO *et al.*, 2003). A expressão de *glnZ* é monocistrônica (diferentemente de *glnK* que, geralmente, está associado ao gene *amtB*) e assim como GlnB, sua expressão é controlada pela proteína NtrC, sendo aumentada em condições de limitação de nitrogênio (DE ZAMAROCZY, 1998).

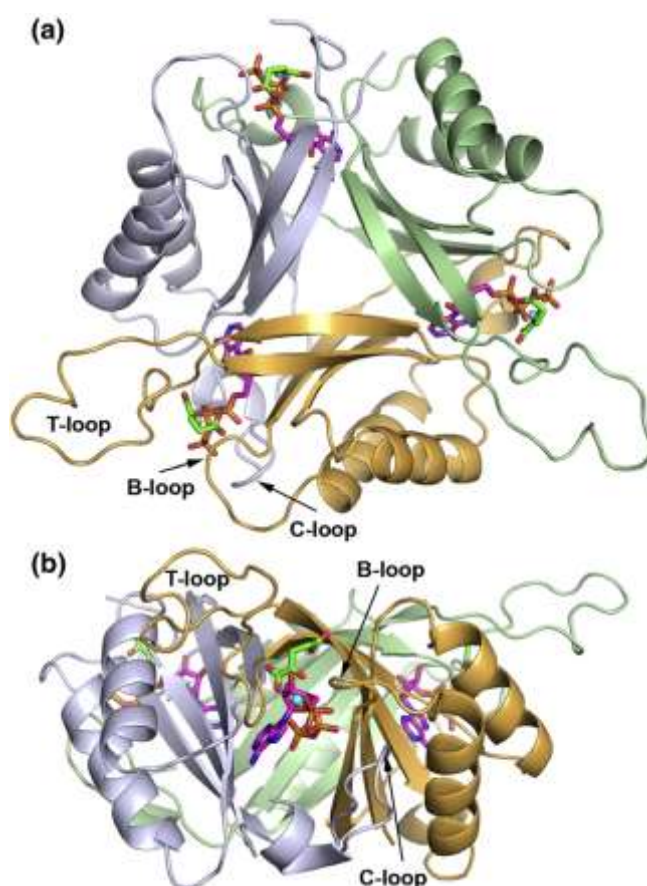


Figura 1- Representação da estrutura do trímero de GlnZ de *A. brasilense*. O trímero com ATP (rosa), 2-OG (verde) e Mg²⁺ (azul) é mostrado em vista superior (A) e lateral (B). *Loop* T (resíduos 37–55), *loop* B (resíduos 82–88), e *loop* C (resíduos 102–105) são indicados por setas. Fonte: Truan e colaboradores, 2010.

Proteínas PII já cristalizadas apresentam alta similaridade na estrutura, sendo compactas, homotriméricas com massa molecular de 12-13 kDa por monômero. Apresentam estrutura de barril compacto onde cada monômero é composto por 2 α -hélices e 4 β -folhas arranjados em um motivo $\beta\alpha\beta$ conectado por uma volta longa denominada volta T (*loop* T). Esse *loop* é exposto ao solvente, altamente conservado e flexível, sendo vital para a interação das PII com diversos alvos (Fig.

1) (FORCHHAMMER, 2008; TRUAN *et al.*, 2010). Proteínas PII apresentam ainda um *loop* menor entre a 2ª α -hélice e a 4ª β -folha denominado *loop* B e um terceiro *loop* na região C terminal denominado *loop* C. Os *loops* T e B de um monômero e C do monômero vizinho formam uma fenda entre as subunidades gerando um sítio de ligação a efetores (Fig. 1).

1.2. Resposta de PII a efetores

Proteínas PII são transdutoras de sinal e apresentam dois modos de percepção de sinal. O primeiro é quase universalmente conservado e consiste na ligação de ATP, ADP e 2-OG aos sítios de ligação a efetores localizados nas três fendas laterais entre os monômeros. A ligação desses efetores pode promover alterações conformacionais no *loop* T, interferindo (positiva ou negativamente) na interação das proteínas PII com proteínas alvo (XU *et al.*, 1998; TRUAN *et al.*, 2010).

Proteínas PII apresentam três sítios de ligação e esses sítios podem ser ocupados por ATP, ATP.Mg, ATP.Mg e 2-OG ou ADP. Em *E. coli*, a ligação de ATP aos sítios apresenta cooperatividade negativa, ou seja, a ligação de ATP ao primeiro sítio diminui a afinidade do segundo e terceiro sítio por ATP. Além disso, ADP se liga de maneira competitiva com ATP (FORCHHAMMER, 2004; JIANG; NINFA, 2007; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010). Essa anticooperatividade na ligação de ATP foi também detectada em outros organismos, como em PII de *Synechococcus elongatus* (FOKINA *et al.*, 2010a) e *Mycobacterium tuberculosis* (JAIN *et al.*, 2013) mas ela não existe para GlnZ de *A. brasilense* (AbGlnZ) (TRUAN *et al.*, 2014). Já na Archea *Archaeoglobus fulgidus*, foi observada anticooperatividade apenas na ligação de ATP ao segundo sítio, enquanto a ligação de ADP foi favorecida após a ligação de ADP ao primeiro sítio de ligação (HELFMANN *et al.*, 2010). Quanto à ligação de efetores, há ainda o efeito relativo à presença de 2-OG. Para as proteínas PII *E. coli*, *Arabidopsis thaliana* e *S. elongatus* a presença de 2-OG favorece a ligação de ATP, aumentando a afinidade de PII por ATP (SMITH; WELJIE; MOORHEAD, 2003; JIANG; NINFA, 2007). Entretanto, esse efeito sinérgico não foi observado para PII de *M. tuberculosis* (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2010), enquanto que *A. fulgidus* não apresenta ligação de 2-OG à PII

(HELFMANN *et al.*, 2010). De acordo com Da Rocha e colaboradores (2013), com base em dados obtidos por modelagem matemática, o efeito sinérgico de ATP e 2-OG poderia ocorrer devido à presença de 2-OG aumentar o número de estados de PII ligados a ATP (Fig. 2), sendo que na ausência de 2-OG, poderiam existir seis estados de PII ligados à ATP, enquanto que na presença de 2-OG esse número aumenta para 16.

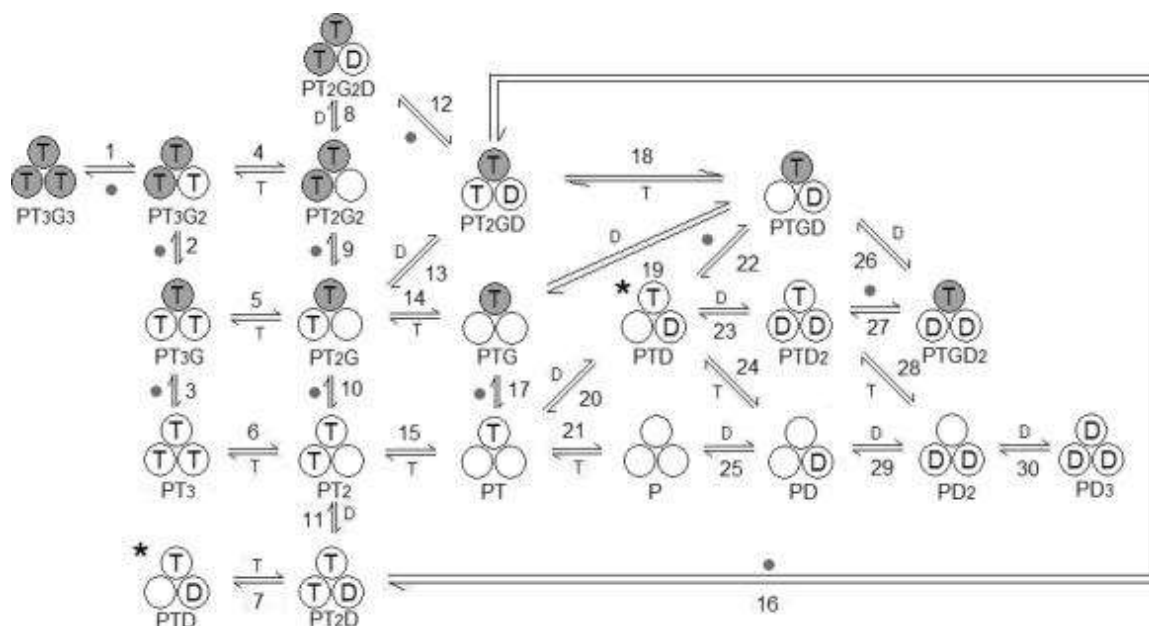


Figura 2 – Representação da ocupação dos sítios de PII pelos efetores ATP, ADP e 2-OG. Modelo proposto por Rocha e colaboradores (2013), onde há 30 reações reversíveis de dissociação e 20 possíveis estados de PII. P – PII; D – ADP; T- ATP; G e círculos cinza – 2-OG. * indica a repetição de um estado para evitar sobreposição das setas. • indica a adição de 2-OG. Fonte: (DA ROCHA *et al.*, 2013)

Proteínas PII são reconhecidas por sensoriar e regular o estado de nitrogênio celular, que é principalmente sinalizado por glutamina e 2-OG que atuam como efetores alostéricos de GlnD e PII, respectivamente (KAMBEROV; ATKINSON; NINFA, 1995). 2-OG sinaliza o estado de nitrogênio da célula por participar da sua assimilação, pela via GS/GOGAT (Glutamato sintase ou Glutamina:2-oxoglutarato aminotransferase) (Fig. 3). Depois de sintetizados, glutamato e glutamina darão origem a outros compostos (LEIGH; DODSWORTH, 2007). Desse modo, 2-OG serve como esqueleto carbônico para a síntese de aminoácidos e sua concentração intracelular pode sinalizar deficiência (alto 2-OG) ou suficiência (baixo 2-OG) de nitrogênio (HUERGO *et al.*, 2012).

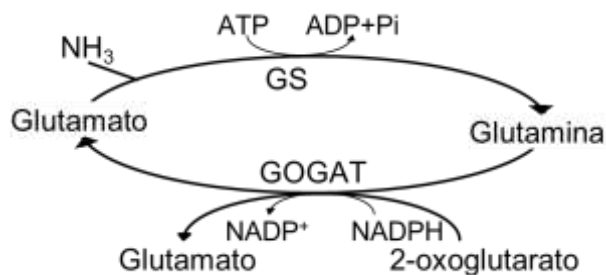


Figura 3 - Via GS/GOGAT de assimilação de amônio. Em *A. brasilense*, a assimilação de amônio se dá principalmente pela via glutamina sintetase (GS)/glutamato sintase (GOGAT). GS incorpora uma molécula de amônio a uma de glutamato, gerando glutamina de forma ATP-dependente. Em seguida, GOGAT transfere o grupamento amina da glutamina para o 2-oxoglutarato (2-OG) produzindo duas moléculas de glutamato, de forma NADPH-dependente.

Quanto à ocupação dos sítios, um único trímero de PII pode apresentar seus três sítios ocupados por diferentes ligantes, em 20 diferentes combinações, conforme mostrado na Fig. 2. Devido à capacidade de PII ligar tanto ATP quanto ADP, surgiu a hipótese de que essas proteínas poderiam sensoriar o estado energético da célula refletido na relação ATP/ADP. Dosagens de ATP e ADP em *E. coli* indicaram que a proporção desses metabólitos varia pouco, sendo a concentração de ATP, geralmente, de 6 a 10 vezes maior que a de ADP (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010). YAGINUMA e colaboradores (2014) verificaram através da técnica de imagem quantitativa de células únicas que, dentro de um mesmo *pool* de células, pode haver uma alteração significativa nos níveis de ATP, tendo sido obtida a concentração de $1,5 \pm 1,2$ mM para as células de *E. coli* analisadas. Entretanto, os autores ressaltam que a partir desse dado não se pode afirmar se houve ou não variação na proporção ATP:ADP em cada célula individualmente. Além disso, a quantificação da concentração intracelular de ATP pode variar conforme o método utilizado. Schneider e Gourse (2004) analisaram a concentração de ATP durante o crescimento de *E. coli* por duas técnicas diferentes: atividade de luciferase e extração de ATP com ácido fórmico. Os autores verificaram que embora o perfil obtido fosse semelhante para os dois métodos, os valores obtidos variaram, uma vez que a extração com ácido leva à quantificação de todo o *pool* de ATP intracelular enquanto que a quantificação por luciferase mede apenas o ATP disponível (não ligado à macromoléculas).

Dados preliminares de quantificação de metabólitos em *A. brasilense* crescido em limitação de nitrogênio indicam que a razão ATP/ADP permanece praticamente inalterada em resposta à variação de nitrogênio (~5 vezes mais ATP), enquanto que

a concentração de 2-OG variou de 4,5 para 1,7 mM após choque de amônio (GERHARDT, 2012). Em *E. coli*, a razão ATP/ADP passou de 7 para 3 após choque de amônio em células crescidas em condição limitante e a concentração de 2-OG diminuiu de 1,4 para 0,3 mM (JIANG; NINFA, 2007; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010). A discrepância na faixa de valores obtidos para 2-OG (entre *A. brasilense* e *E. coli*) pode ser um artefato dos diferentes métodos utilizados, uma vez que a concentração desse metabólito é extremamente sensível a pequenas variações, tendo uma meia vida de 0,5 s e podendo ser depletado ou acumulado rapidamente em resposta a pequenas variações como de temperatura durante a coleta e centrifugação e alteração no acesso a oxigênio e nutrientes após a sedimentação de células por centrifugação (YAN; LENZ; HWA, 2011).

Como descrito anteriormente, em alguns organismos a presença de 2-OG favorece a ligação de ATP às proteínas PII (JIANG; NINFA, 2007; RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010). Desse modo, a ligação de 2-OG a GlnK de *E. coli* está relacionado ao aumento da afinidade desta proteína por ATP e diminuição da afinidade por ADP, sendo que o efeito antagonista 2-OG-ADP parece ser crítico para a formação do complexo GlnK-AmtB (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010).

Em *A. brasilense*, ensaios de interação *in vitro* entre GlnZ-DraG e GlnZ-AmtB (ligantes conhecidos de GlnZ), utilizando diferentes concentrações de efetores sugerem que, em AbGlnZ, a ligação de ATP ou ADP é determinada pela concentração de 2-OG (GERHARDT *et al.*, 2012). Altas concentrações de 2-OG favorecem a ligação de ATP, enquanto baixas concentrações de 2-OG ou sua ausência favorecem a ligação de ADP, mesmo quando a concentração de ATP é 9 vezes maior que a de ADP. Esses dados indicam que talvez proteínas PII sensoriem mais o estado de nitrogênio/carbono da célula (via 2-OG) do que o balanço energético celular.

Entretanto, existe a condição do organismo *A. fulgidus*, no qual a proteína GlnK não possui a capacidade de ligar 2-OG. *A. fulgidus* apresenta 3 pares Amt/GlnK, sendo que dois pares estão relacionados à captação de amônio e o terceiro (Amt/GlnK2) ainda tem sua função desconhecida. Os autores sugerem que, nesse organismo, GlnK responda apenas à variação do estado energético (ATP/ADP), e não à variação de nitrogênio. Análise das constantes de ligação de ATP e ADP indicaram que ATP.Mg se liga com maior afinidade que ADP.Mg, porém

a ligação da segunda molécula de ATP sofre efeito de anticooperatividade, enquanto a ligação do segundo e terceiro ADP são favorecidos por cooperação positiva, favorecendo que o ADP permaneça ligado à PII e seja substituído apenas quando a concentração de ATP aumenta, sugerindo uma resposta complexa à ligação de ATP e ADP (HELFMANN *et al.*, 2010).

Devido à pouca variação da razão ATP/ADP em *E. coli*, Radchenko e colaboradores (2013) buscaram uma outra explicação para a ligação de nucleotídeos à PII. Eles verificaram que PII de *E. coli*, *A. brasilense* e *A. thaliana* apresentam atividade ATPásica, sugerindo que essa seja uma função conservada dessas proteínas. O efeito de ATPase de PII foi comparado pelos autores ao mecanismo da proteína G α , que liga GTP e o hidrolisa a GDP. No mecanismo proposto, EcGlnK encontra-se inicialmente ligada a ATP.Mg e 2-OG, em baixa concentração de nitrogênio. Uma vez que os níveis de nitrogênio aumentem, com consequente queda nos níveis de 2-OG, EcGlnK hidrolisaria ATP a ADP, utilizando a energia liberada na hidrólise para promover uma alteração conformacional no *loop* T. De acordo com essa proposta, a função da ligação de ATP e ADP seria apenas facilitar a alteração conformacional dependente de 2-OG nas proteínas PII. Essa função de ATPase de PII foi inicialmente sugerida por Gruswitz, O'connell e Stroud (2007), mas além dos dados de Radchenko e colaboradores, nenhuma outra PII foi confirmada com essa função. Esse modelo propõe que PII não seja capaz de sensoriar o balanço energético. Entretanto, ele não pode ser extrapolado a todas as PII, uma vez que se sabe da existência de PII que não ligam 2-OG. Lüddecke e Forchhammer (2015) testaram a hipótese de atividade ATPásica para PII de *S. elongatus*. Através de sensores fluorescentes fusionados à PII e à NAGK, eles avaliaram se a presença de ADP interferia na formação/estabilidade do complexo PII-NAGK (que é estabilizado na presença de ATP) e também se PipX (que liga PII na presença de ADP) seria capaz de competir com NAGK pela ligação de PII. Os autores verificaram que PipX compete com NAGK, sendo essa competição aumentada seguindo o aumento de ADP adicionado à reação, indicando que a ligação PipX-PII depende tanto da razão ATP/ADP quanto da concentração absoluta de ADP. Os autores concluíram que para *S. elongatus*, o modelo de atividade ATPásica de PII não é relevante, sendo a concentração de ATP, ADP e 2-OG os determinantes para a interação de PII com NAGK e PipX. Além disso, eles ponderam que o modelo proposto de atividade ATPásica deveria ser testado para

cada PII, e para cada interação específica, podendo o modelo ser válido para GlnK-AmtB (conforme proposto por RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2013), mas não necessariamente para as demais interações de PII.

O segundo modo de percepção de sinal de PII é uma modificação covalente na região do *loop* T, que não é universalmente conservada. Essa modificação pode ser uridililação do resíduo tirosina (Tyr) 51 em proteobactérias, adenilação da Tyr 51 em Actinomycetos ou fosforilação do resíduo Serina (Ser) 49 em cianobactérias; (FORCHHAMMER, 2004; HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013; MERRICK, 2015), não ocorrendo em Bacillus, Archaea, plantas e algas eucarióticas (CHELLAMUTHU *et al.*, 2014). Em proteobactérias, esta modificação é realizada pela enzima bifuncional GlnD (uridililtransferase/removedora de uridilil - UTase/UR).

Ensaio *in vitro* com as proteínas GlnB e GlnZ indicam que as proteínas PII de *A. brasilense* são uridililadas pela enzima GlnD na presença de ATP e 2-OG, sendo a uridililação inibida por glutamina (ARAUJO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2008), podendo as PII serem encontradas, de forma geral, como trímeros livres, mono (PII-UMP₁), di (PII-UMP₂) ou tri-uridililados (PII-UMP₃) e sua modificação covalente é importante para direcionar sua interação com suas proteínas alvo, como DraT, DraG e AmtB (VAN DOMMELEN *et al.*, 2002; HUERGO *et al.*, 2006b, 2007, 2009; ZHU *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2011).

Recentemente, Chellamuthu e colaboradores (2014) demonstraram que na alga unicelular *Chlamydomonas* e nas plantas *Physomitrella* e *Oryza sativa* as proteínas PII são reguladas alostericamente por glutamina, em uma região extra na porção C-terminal da proteína. Essa região extra foi denominada *loop* Q e possui de 15 a 19 aminoácidos, sendo encontrada na grande maioria das proteínas PII do cloroplasto de algas e plantas, mas com algumas exceções, como *A. thaliana*, por exemplo. O *loop* Q é essencial para a ligação de PII à proteína NAGK (N-acetilglucosamina quinase) (complexo PII-NAGK é conservado em cianobactérias e plantas). A descoberta da ligação de glutamina à PII demonstra que as proteínas PII em plantas podem atuar como um módulo sensor capaz de ligar ATP, ADP, 2-OG e glutamina. Estes dados reforçam a plasticidade das proteínas PII e sua importância na regulação do metabolismo.

1.3. Funções de PII

A regulação do metabolismo de nitrogênio mediada pelas proteínas PII é caracterizada por interações proteína-proteína e responde à variação de efetores descrita acima. A proteína GlnB de *E. coli* (EcGlnB) sensoria o estado de nitrogênio celular integrando o sinal de 2-OG e glutamina, o primeiro por ligação alostérica e o segundo pelo efeito de glutamina sobre GlnD (LEIGH; DODSWORTH, 2007). A alta concentração de glutamina ativa a função UR de GlnD, que remove os grupamentos uridilil de PII. EcGlnB desuridililada interage com a enzima Adenilil transferase (ATase), sinalizando alta concentração de nitrogênio e promovendo a inativação da glutamina sintetase (GS) por adenilação progressiva de suas 12 subunidades. Quando a concentração de nitrogênio disponível é baixa, GS é ativada por desadenilação também catalisada pela ATase complexada à proteína GlnB-UMP (NINFA; JIANG, 2005; LEIGH; DODSWORTH, 2007). A interação PII-ATase é desfavorecida em altas concentrações de 2-OG (JIANG; PELISKA; NINFA, 1998; ATKINSON; NINFA, 1999). EcGlnB não uridililada regula ainda a atividade da proteína NtrB que, por sua vez, regula o estado de fosforilação da proteína NtrC.

A proteína paróloga de EcGlnB, EcGlnK, é co-expressa com o gene *amtB*, que codifica para uma proteína transmembrana envolvida no transporte de amônio (AmtB). As proteínas EcGlnK e EcGlnB apresentam 67% de identidade (VAN HEESWIJK *et al.*, 1996) e apresentam funções sobrepostas, como o controle da atividade de NtrB e da ATase, embora EcGlnB seja mais efetiva nessas funções (ATKINSON; NINFA, 1999). EcGlnK, assim como EcGlnB, responde a sinais de estado de nitrogênio por uridililação no resíduo 51 (ATKINSON; NINFA, 1998). Uma das funções mais estudadas de EcGlnK é a sua interação com AmtB que promove o bloqueio do canal transportador de amônio. Essa interação ocorre pela região do *loop T*, ocorrendo apenas quando EcGlnK encontra-se desuridililada (RADCHENKO; THORNTON; MERRICK, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2011).

As proteínas PII de *A. brasilense*, GlnB (AbGlnB) e GlnZ (AbGlnZ), apresentam 112 resíduos de aminoácidos e 81% de similaridade (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996) e, apesar da alta similaridade, desempenham diferentes funções. AbGlnB participa da regulação de NifA por amônia, se ligando à região N-terminal (domínio GAF) de NifA quando a quantidade de nitrogênio disponível é baixa, e ao

se ligar, remove o efeito inibitório que o domínio GAF exerce sobre o restante da proteína, levando assim à ativação de NifA (DE ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993; ARSENE; KAMINSKI; ELMERICH, 1996). AbGlnZ e AbGlnB estão relacionadas com o transporte de íons amônio (DE ZAMAROCZY, 1998; HUERGO *et al.*, 2007), ambas tem a capacidade de interagir com AmtB (HUERGO, *et al.*, 2007) e estão envolvidas na regulação pós-traducional da nitrogenase em resposta à amônio (HUERGO *et al.*, 2005, 2007; KLASSEN *et al.*, 2005), sendo que AbGlnB sensoria o rápido aumento na concentração de amônio enquanto AbGlnZ é principalmente responsável por sinalizar o retorno a condições de depleção de amônio (KLASSEN *et al.*, 2005).

Proteínas PII interagem com suas proteínas alvo em resposta à concentração de efetores, que interferem em sua estrutura e estado de uridililação. A interação de AbGlnB com DraT é favorecida quando AbGlnB está desuridililada, em alta concentração de ADP (HUERGO *et al.*, 2006a, 2009) e em condições de alta concentração de amônio, tendo como consequência a ativação de DraT e inativação da NifH (MOURE *et al.*, 2013), uma vez que as condições são desfavoráveis à fixação. DraG por sua vez, interage com AbGlnZ tanto na forma uridililada quanto desuridililada, mas a interação é mais favorecida quando AbGlnZ encontra-se desuridililada, sendo que essa interação ocorre na presença de ADP mas não de ATP ou AMP (HUERGO *et al.*, 2009). O modelo proposto com base em evidências experimentais obtidas até agora indica que em condições de fixação de nitrogênio, DraG se encontra no citoplasma desligada de AbGlnZ uridililada (HUERGO *et al.*, 2012) e, assim, NifH está ativa. Após um choque de amônio, AbGlnZ é desuridililada e se liga a DraG. Quando desuridililada e na presença de ADP, AbGlnZ interage simultaneamente com AmtB e DraG, formando um complexo ternário AmtB-GlnZ-DraG que é necessário para inativação de DraG *in vivo* (HUERGO *et al.*, 2007, 2009).

S. elongatus expressa apenas uma proteína PII, SeGlnB, codificada pelo gene *glnB*. SeGlnB, assim como PII de plantas, estão relacionadas ao controle da biossíntese de arginina, atuando como ativador da enzima NAGK (BEEZ *et al.*, 2009). A ligação de PII à NAGK ocorre na presença de ATP e, uma vez formado o complexo, NAGK é ativada pela ligação de PII por remoção da retroinibição causada por arginina (produto de NAGK). O complexo PII-NAGK é desestabilizado na presença de altas concentrações de 2-OG (FOKINA *et al.*, 2010a). Além disso, a

interação NAGK-PII de plantas é afetada por glutamina. A maioria das plantas superiores apresentam uma extensão na região C-terminal de PII (*loop Q*) que requer a ligação de glutamina para a formação do complexo NAGK-PII (CHELLAMUTHU *et al.*, 2014)

1.4. Identificação de novas proteínas capazes de interagir com PII

Todas as interações descritas acima estão relacionadas ao metabolismo de nitrogênio. Entretanto, além de sinalizar deficiência de nitrogênio, os níveis de 2-OG têm potencial para sinalizar suficiência de carbono celular (COMMICHAU; FORCHHAMMER; STÜLKE, 2006). 2-OG é um intermediário do ciclo do ácido cítrico, estando assim diretamente relacionado aos níveis de carbono celular, sendo também um precursor para a síntese de aminoácidos e participando da assimilação de nitrogênio na forma de amônio via Glutamina Sintetase (GS). A concentração de 2-OG pode variar em resposta à disponibilidade de carbono (diretamente proporcional) e disponibilidade de nitrogênio (inversamente proporcional), sendo, assim, um excelente regulador para proteínas que sensoriam carbono e nitrogênio.

Recentemente, foi mostrado que proteínas PII são capazes de regular enzimas relacionadas ao metabolismo de carbono, indicando que estas proteínas podem sensoriar os níveis de carbono celular. A proteína PII de *A. thaliana* se localiza no cloroplasto e é capaz de inibir a enzima chave na biossíntese de lipídeos Acetil-CoA carboxilase (ACC) e essa inibição é diminuída na presença de 2-OG, oxaloacetato (OAA) ou piruvato (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010). Além disso, dados obtidos em *A. thaliana* por Baud e colaboradores (2010) mostraram que houve um aumento no conteúdo de ácidos graxos durante a maturação das sementes em plantas com deleção de PII, indicando que PII participa do ajuste fino na produção de ácidos graxos do processo de maturação de sementes. Esses dados reforçam o efeito modulatório de PII sobre ACC e abrem possibilidades para aumentar a produtividade de óleos em semente e, conseqüentemente, a produção de biodiesel a partir de sementes oleaginosas.

Outras proteínas conhecidas por interagirem com PII em outros organismos são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Proteínas que interagem com proteínas PII

Organismo	Proteínas com as quais PII interagem	Função de PII	Referências
<i>E. coli</i>	NtrB-NtrC	Regula atividade do sistema, controlando transcrição de vários genes envolvidos com a regulação do metabolismo de nitrogênio	Jiang e Ninf, (1999)
	AmtB e ATase	Modula captação e assimilação de amônio, respectivamente	Javelle <i>et al.</i> , (2004); Jiang <i>et al.</i> , (2007);
Cianobactérias e plantas	NAGK	Controla biossíntese de arginina	Heinrich <i>et al.</i> , (2004); Burillo <i>et al.</i> , (2004)
Gram-negativas e cianobactérias	TnrA, AmtR e GlnR	Regula fatores transcricionais relacionados ao nitrogênio	Nolden <i>et al.</i> , (2001); Heinrich <i>et al.</i> , (2006); Castellen <i>et al.</i> , (2011)
Cianobactérias	PipX e PamA	Regula fatores transcricionais relacionados ao nitrogênio	Forchhammer, (2008); Osanai <i>et al.</i> , (2005)
Diazotrofos	DraG, DraT, AmtB, NifA	Regulam síntese e atividade da nitrogenase	Dixon e Kahn (2004); Sarkar <i>et al.</i> , (2012); Chen <i>et al.</i> , 2003; Huergo <i>et al.</i> , (2006), (2009), (2012)
	NifL	Controle transcricional da fixação de Nitrogênio	Huergo, <i>et al.</i> , (2013)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	BCCP	Controla a atividade da enzima Acetil Co-A carboxilase	Feria Bourrellier <i>et al.</i> , (2010)

Fonte: a autora.

Acredita-se que todas as interações descritas acima, com exceção da interação DraG-GlnZ, ocorrem pela região do *loop* T. Além das interações diretas, PII podem estar envolvidas na formação de complexo protéicos ternários como por exemplo DraG-GlnZ-AmtB em *A. brasilense* (HUERGO *et al.*, 2007) e do complexo AmtB-GlnK-TnrA em *Bacillus subtilis* (SCHUMACHER *et al.*, 2015).

Dada a possibilidade de PII atuar como um sensor de uma variedade de sinais acredita-se que a lista de proteínas reguladas por interação com proteínas PII é muito maior do que as interações já descritas (FORCHHAMMER, 2008). Apesar de praticamente todas as interações descritas até hoje estarem relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, já foi descrita uma interação relacionando PII ao metabolismo de carbono. Além disso, análises de vizinhança gênica indicam que PII

poderiam regular a enzima NAD sintetase e a assimilação de nitrato, sugerindo que a lista de alvos de proteínas PII deve ser maior que as interações conhecidas (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013).

1.5. Acetil-CoA carboxilase

A primeira enzima descrita como alvo de PII que não está relacionada ao metabolismo de nitrogênio foi a proteína BCCP de *A. thaliana*. Essa proteína é uma subunidade da enzima acetil-CoA carboxilase.

Acetil-CoA carboxilase (ACC, E.C. 6.4.1.2) é uma enzima chave no metabolismo de lipídeos e atua na primeira etapa da síntese de ácidos graxos, sendo encontrada em todos os domínios de vida com exceção de archaea (CRONAN JR.; WALDROP, 2002). As primeiras ACCs estudadas foram as de mamíferos, que assim como fungos e aquelas localizadas no citosol de plantas, apresentam uma proteína composta de um único polipeptídeo com 3 domínios funcionais. Por outro lado, na maioria das bactérias e no cloroplasto de plantas a enzima ACC geralmente é composta por três diferentes proteínas (MS-ACC), denominadas Carboxil Transferase (CT), Biotina Carboxilase (BC) e Proteína Carreadora de Carboxil Biotina (BCCP) (Fig. 4A).

ACC catalisa a carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA em uma reação de duas etapas como mostrado na figura 4B. Inicialmente, BC adiciona um grupo carboxil proveniente do bicarbonato à biotina ligada a BCCP com a utilização de uma molécula de ATP. Na segunda etapa, CT (heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$) catalisa a transferência do grupo carboxil ligado à biotina para uma molécula de acetil coenzima A (acetil CoA), gerando malonil-CoA, que é o substrato utilizado nas etapas seguintes da síntese de ácidos graxos.

Análises filogenéticas indicam que ACCs monoméricas e de multisubunidades tem um ancestral comum, anterior à separação entre Archea e Bacteria (LOMBARD; MOREIRA, 2011). Todas as ACCs monoméricas apresentam a mesma organização estrutural dos domínios: NH₂-BC-BCC-CT-COOH (NIKOLAU; OHLROGGE; WURTELE, 2003). Animais e fungos apresentam duas isoformas de ACC, denominadas ACC1 e ACC2 (ambas formadas por um único polipeptídeo) (Fig. 5).

ACC1 humana é a melhor estudada e está presente no citosol, enquanto ACC2 está na mitocôndria (PODKOWIŃSKI; TWORAK, 2011). ACC1 produz malonil-CoA para síntese de ácidos graxos, enquanto ACC2 está principalmente envolvida com a regulação da β -oxidação através da inibição de carnitina palmitoil transferase I (CPT1) por malonil-CoA gerado por ACC2 (ABU-ELHEIGA *et al.*, 2000). ACC citosólica de plantas produz malonil-CoA para diferentes vias metabólicas, como alongação de ácidos graxos e biossíntese de uma variedade de metabólitos secundários.

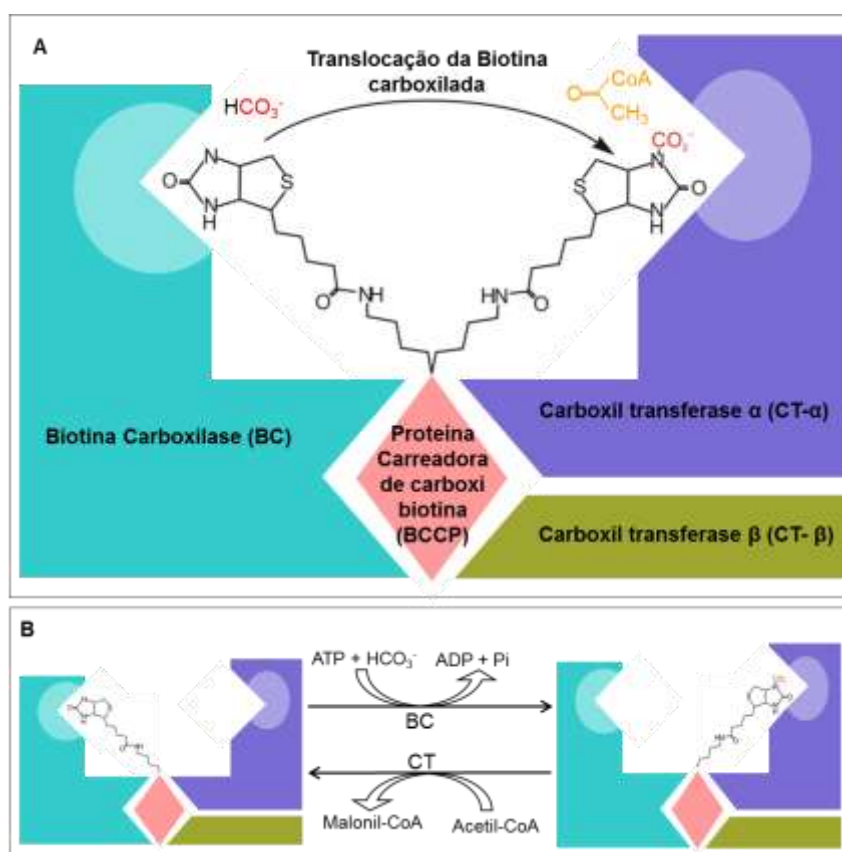


Figura 4 - Esquema da estrutura de ACC. (A) – esquema geral da estrutura de ACC em *E. coli*, com 4 peptídeos. **(B)** – Esquema da reação catalisada por ACC. Azul – BC; Rosa – BCCP; Verde – CT β ; Lilás – CT α . Fonte: adaptado de PODKOWIŃSKI e TWORAK (2011)

Já ACC plastidial de plantas é multimérica (MS-ACC) (Fig. 5) e a produção de malonil-CoA está relacionada ao desenvolvimento de sementes, onde os ácidos graxos formados serão usados na composição de membranas ou para acúmulo de triacilglicerol (NIKOLAU; OHLROGGE; WURTELE, 2003). Dentre as ACCs bacterianas, a melhor estudada é a de *E. coli* (EcACC), apresentando ACC

organizada em três partes catalíticas, formadas por 4 peptídeos (Fig. 5). A maioria das ACCs de bactérias segue a mesma organização estrutural que a observada na ACC de *E. coli*.

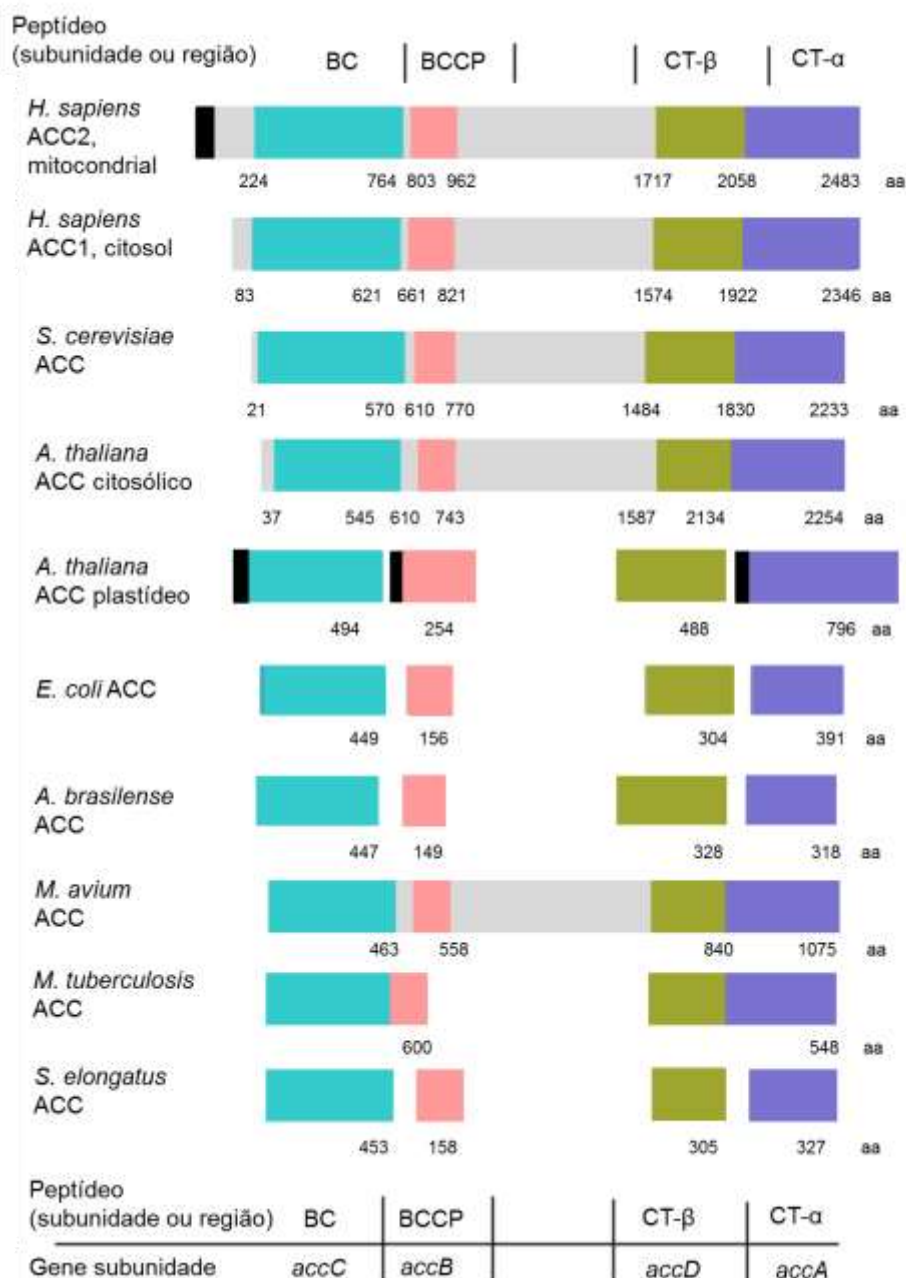


Figura 5 – Acetil-CoA carboxilase em diferentes organismos. Cinza – Indica região entre os domínios de ACC monomérica; Azul – BC; Rosa – BCCP; Verde – CT-β; Lilás – CT-α; preto – peptídeo sinal para plastídio (*A. thaliana*) ou membrana mitocondrial (*H. sapiens*) Fonte: adaptado de PODKOWIŃSKI e TWORAK (2011).

Actinobacterias como *Streptomyces coelicolor*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Rhodococcus jostii* apresentam uma organização única de ACC, apresentando várias isoformas com diferentes funções e com os domínios BCCP- BC (*accA*) e CT α - β (*accD*) fusionados formando dois polipeptídeos que compõem a ACC funcional, com diferentes combinações de polipeptídeos ACCAD (GAGO *et al.*, 2011).

1.6. Subunidade Proteína carreadora de carboxi-biotina (BCCP)

A subunidade BCCP (proteína carreadora de biotina) é codificada pelo gene *accB*, e em *E. coli* corresponde a uma proteína de 156 aminoácidos (17 KDa). BCCP possui um domínio biotinil e é biotinilada *in vivo* pela proteína Biotina-ligase (EC 6.3.4.15; BirA). Análises de estruturas cristalográficas do domínio biotinoil de EcBCCP indicam uma estrutura simétrica com dois grupos de quatro β -folhas antiparalelas (Fig. 6) (ATHAPPILLY; HENDRICKSON, 1995). Entretanto, a simetria da proteína é rompida pela presença de uma estrutura protuberante de 8 resíduos (94-101) denominada *thumb*. Essa região marca a separação das regiões N- e C-terminal de BCCP, sendo que os resíduos 94-97 pertencem à região N-terminal e 98-101, à região C-terminal. O *thumb* foi observado interagindo com o anel uriedo da biotina (ligada à lisina 122, que se encontra na região C-terminal, altamente conservada) (Fig. 6B), e parece estabilizar a biotina ligada à BCCP (ATHAPPILLY; HENDRICKSON, 1995; SOLBIATI; CHAPMAN-SMITH; CRONAN, 2002).

Carboxilases dependentes de biotina são uma família de proteínas altamente conservadas, e a região do domínio biotinoil é especialmente conservada. Entretanto, nem todos os domínios biotinoil apresentam o *thumb*. Todos os domínios biotinoil de ACC apresentam o *thumb*, estando presente em todas as enzimas que sintetizam malonil-CoA, sendo específica para organismos que sintetizam ácidos graxos (CRONAN, 2001). Entretanto, sua função não é completamente entendida, uma vez que ele não é essencial para a biotinilação, nem para a estabilidade da proteína (CRONAN, 2001; BROUSSARD *et al.*, 2013a). Sua interação com o uriedo da biotina sugere que o *thumb* possa atuar como uma tampa móvel para os sítios ativos de BC e CT, podendo prevenir a entrada de moléculas de água no sítio ativo.

Porém, embora sua função não seja completamente conhecida, essa região parece ser essencial para o crescimento de *E. coli*, uma vez que mutantes com deleção do *thumb* ou substituição de 7 de seus resíduos por alanina foram incapazes de crescer a 37°C (CRONAN, 2001).

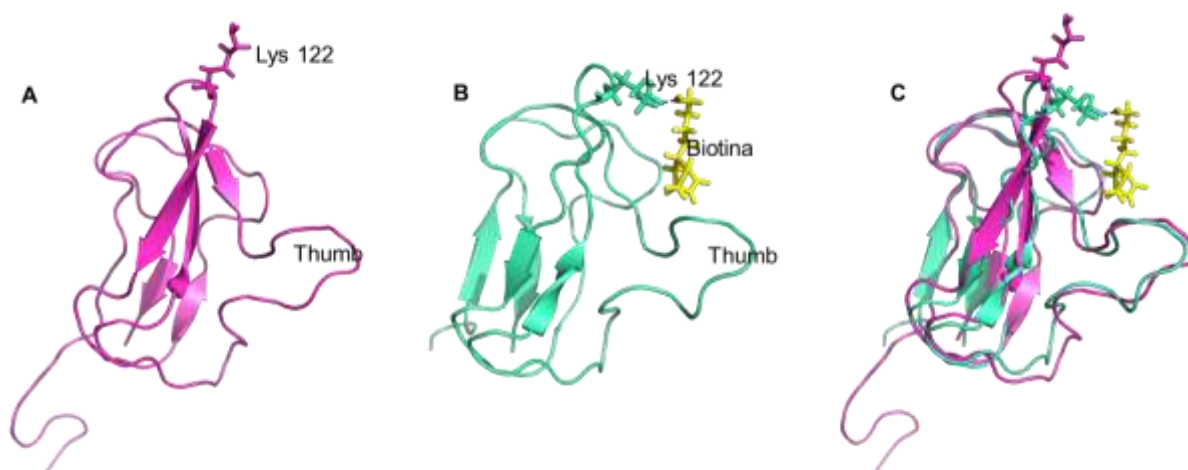


Figura 6 – Estrutura de BCCP de *E. coli*. (A) – ApoBCCP (PDB 1A6X). (B) – HoloBCCP (PDB 2BDO). (C) – Sobreposição das formas Apo- e HoloBCCP. Em (B) e (C) a biotina ligada à lisina 122 é mostrada em amarelo. Figura gerada com o programa Pymol. Fonte: a autora.

Análises de formas truncadas de BCCP mostraram que o peptídeo mínimo passível de biotinylação em *E. coli* tem entre 75 e 80 resíduos (CRONAN, 1990) e a partir disso, vários trabalhos foram realizados utilizando a forma truncada de BCCP BCCP87, com os 87 aminoácidos da região C-terminal. BCCP87 é biotinilada da mesma forma que a BCCP inteira, indicando que biotinylação é independente da região N-terminal (CHAPMAN-SMITH *et al.*, 1994; NENORTAS; BECKETT, 1996). Além disso, BCCP87 é monomérica, enquanto BCCP inteira tende a formar agregados (NENORTAS; BECKETT, 1996). Ensaios de atividade de ACC utilizando BCCP87 indicaram que ela serve de substrato das duas reações de ACC, servindo de substrato para BC e CT (BLANCHARD *et al.*, 1999).

A biotinylação de BCCP *in vivo* é realizada pela proteína biotina ligase (BirA), e em *E. coli* BCCP é o único substrato conhecido de BirA (BCCP é única proteína biotinilada em *E. coli*). Outras bactérias podem apresentar até cinco proteínas biotiniladas (CHAPMAN-SMITH; CRONAN, 1999). BirA é extremamente específica na reação catalisada, reconhecendo a lisina (K) que, em *E. coli*, está na posição 122. Além disso, vários autores descreveram os resíduos de metionina (M)

adjacentes como importantes para o reconhecimento do sítio de biotinylation por BirA, formando o motivo conservado MKM (CHAPMAN-SMITH; CRONAN, 1999; CHAPMAN-SMITH *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2008). Entretanto, Kimura e colaboradores (2000) verificaram que BCCP de *Myxococcus xanthus* não apresentam domínio MKM, mas sim MKL e, ainda assim, é eficientemente biotinilado por EcBirA. O alinhamento das sequências de *E. coli*, *A. brasilense*, *S. elongatus* e *M. xanthus* (Fig. 7) mostra que a sequência MKM poderia ser indicada como MKX, onde X corresponde a metionina (M), leucina (L) ou valina (V). Em *Mycobacterium tuberculosis*, BC e BCCP são encontradas em único peptídeo, apresentando 3 isoformas (ACCA 1-3), e o alinhamento de ACCA3 de *M. tuberculosis* com EcBCCP indica que a porção BCCP apresenta a sequência MKM conservada, e embora a organização da proteína MtACCA seja diferente, ela é eficientemente biotinilada por EcBirA (GAGO *et al.*, 2006).

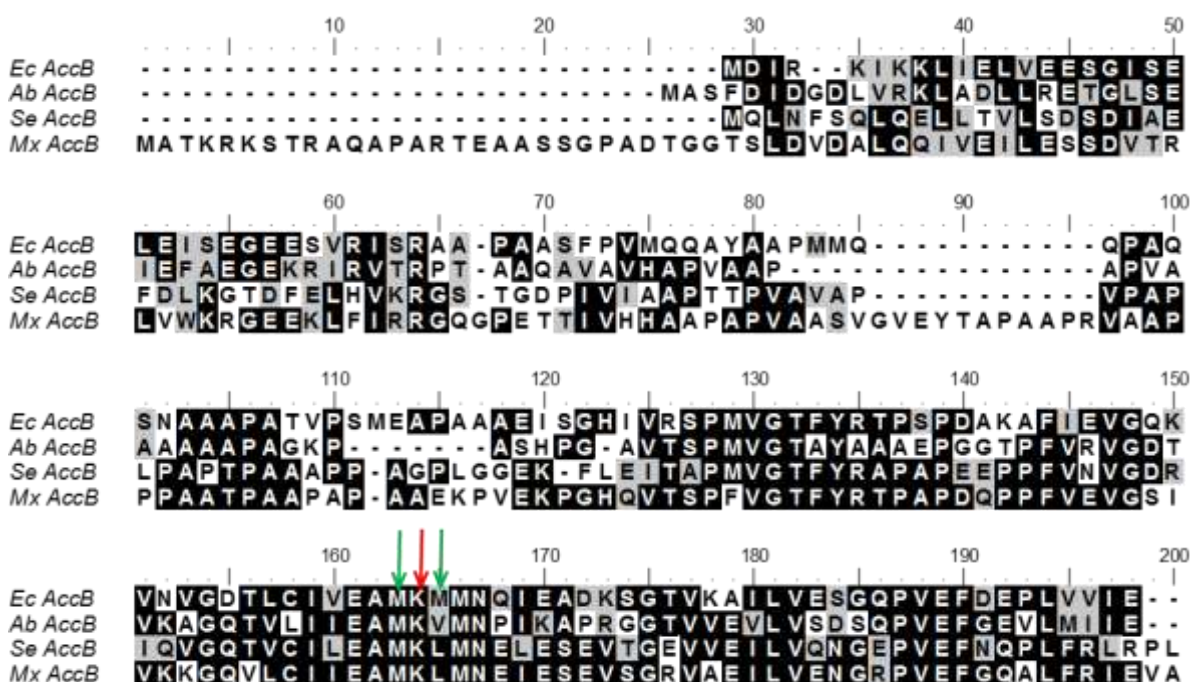


Figura 7 - Alinhamento de BCCP de *Escherichia coli*, *Synechococcus elongatus*, *Azospirillum brasilense* e *Myxococcus xanthus*. Aminoácidos iguais são mostrados em preto, similares em cinza e diferentes sem marcação. Seta vermelha indica lisina conservada, e setas verdes indicam resíduos adjacentes a lisina, essenciais à biotinylation. Ec - *Escherichia coli* (NCBI - WP_000354620.1); Se - *Synechococcus elongatus* (NCBI - WP_011243856.1); Ab - *Azospirillum brasilense* (NCBI - WP_014241157.1); Mx - *Myxococcus xanthus* (NCBI - WP_011555719.1). Alinhamento realizado no programa Bioedit.

1.7. Subunidade Biotina Carboxilase

Biotina Carboxilase (BC) pertence à família de proteínas ATP-grasp (GALPERIN; KOONIN, 1997) que catalisam a ligação dependente de ATP entre um grupo amina e um grupo carboxilato. BC catalisa a primeira etapa da atividade de ACC, que consiste na carboxilação da biotina, utilizando bicarbonato como doador de carbono, de modo ATP dependente.

Em *E. coli*, BC é codificada pelo gene *accC*, possui 449 aminoácidos por monômero, é encontrada em solução como dímero e o seu gene é cotranscrito com *accB* (LI; CRONAN, 1992). Embora BC seja um dímero, aparentemente não há comunicação entre as subunidades e elas funcionam de forma independente, tendo sítios ativos independentes (JANIYANI *et al.*, 2001). Foi observada comunicação entre as subunidades apenas quando uma delas contém mutação que altera a atividade enzimática. Além disso, as duas subunidades de BC parecem incapazes de catalisar reações simultaneamente, sendo necessário alternar entre ligação de substrato e catálise (JANIYANI *et al.*, 2001).

BC é capaz de hidrolisar ATP lentamente, independentemente da presença de biotina, porém a velocidade de hidrólise aumenta 860 vezes na presença de biotina livre e 14000 vezes na presença de BCCP87. Esses dados sugerem que há sinergismo entre os substratos a fim de evitar desperdício de ATP na ausência dos demais substratos (BLANCHARD *et al.*, 1999). Na presença de BCCP completa, BC apenas hidrolisa ATP, de forma eficiente, quando em complexo com CT, sugerindo que o complexo impede desperdício de ATP (BROUSSARD *et al.*, 2013a).

BC apresenta 3 domínios: N-terminal, domínio B e domínio C-terminal (WALDROP; RAYMENT; HOLDEN, 1994; CRONAN JR.; WALDROP, 2002). O sítio ativo está localizado na interface entre o domínio B e os outros dois domínios (Fig. 8) (CHOU; YU; TONG, 2009).

A estequiometria do complexo BC-BCCP de *E. coli* foi determinada por Choi-Rhee e Cronan (2003) por cromatografia e análise de metionina marcada e os dados obtidos indicavam que a estequiometria é de quatro monômeros de BCCP para um dímero de BC. Entretanto, a estrutura cristalográfica do complexo EcBC-BCCP obtida por Broussard e colaboradores (2013a) indica a interação de 2 dímeros de BC com 4 monômeros de BCCP, sendo que cada monômero de BCCP forma uma

interface com um monômero de BC do dímero inferior e um monômero do dímero superior (Fig. 8B e C), sendo que BCCP atuaria como um *clip* mantendo os dois dímeros de BC juntos. A estrutura obtida por Broussard e colaboradores (2013a) revelou ainda que apenas a região C-terminal de BCCP está envolvida na interação com BC, sugerindo que a região N-terminal de BCCP teria outra função na qual seja requerido que essa região esteja livre. Uma hipótese ressaltada pelos autores é a possível ligação de BCCP ao DNA, atuando como um repressor transcricional do operon *accBC* (JAMES; CRONAN, 2004; BROUSSARD *et al.*, 2013a).

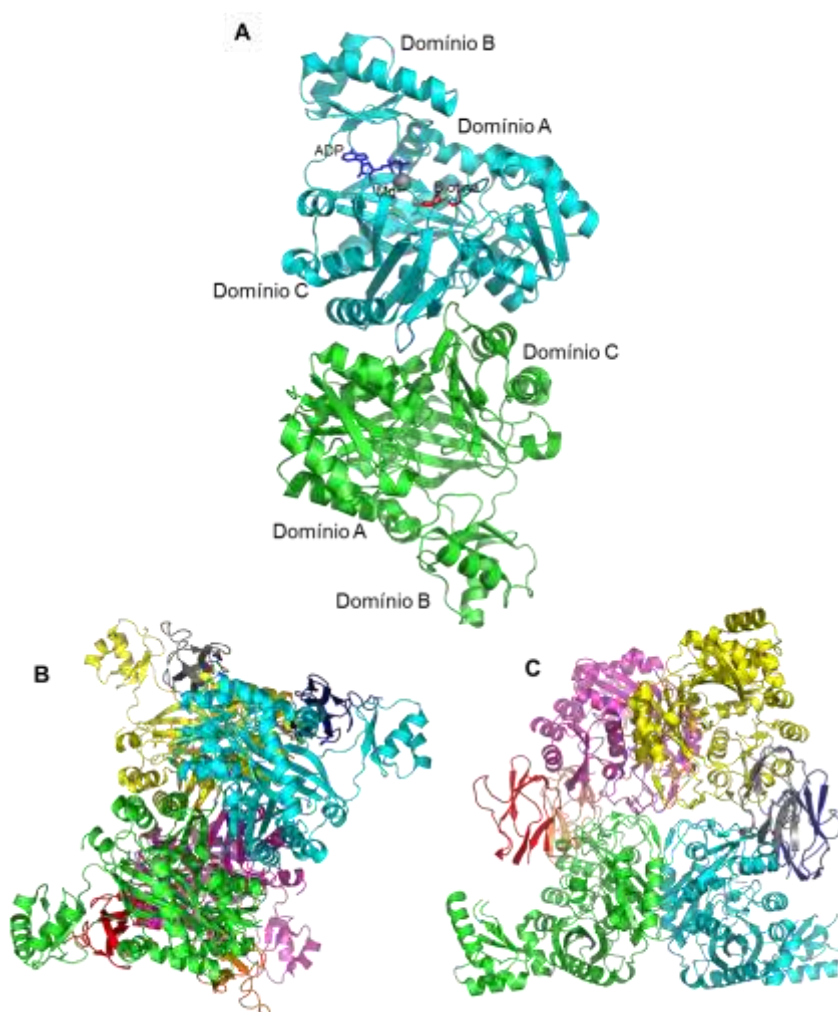


Figura 8 - Estrutura de BC e BC-BCCP de *E. coli*. (A) BC ligada a ADP (azul), biotina (vermelho) e Mg²⁺ (cinza) (PDB 3G8C); domínios de BC estão indicados na figura. (B) – Complexo BC-BCCP – vista superior. (C) – Complexo BC-BCCP – vista lateral. (B) e (C) - PDB 4HR7. Amarelo, azul claro, verde e rosa: BC; azul escuro, cinza, vermelho e laranja: BCCP. Figura gerada no programa Pymol. Fonte: a autora.

O complexo EcBC-BCCP parece, assim como BCCP, formar uma estrutura de alta massa molecular. Embora a massa esperada para uma estequiometria de 2

dímeros de BC, 4 monômeros de BCCP seja de ~260 KDa, a massa observada por gel filtração foi superior a 800 KDa, indicando que o complexo observado por cristalografia poderia ser uma unidade de um complexo maior (por exemplo, três complexos 2BC:4BCCP, formando uma molécula maior, com ~780KDa) (BROUSSARD *et al.*, 2013a).

1.8. Subunidade Carboxiltransferase

Carboxiltransferase (CT) catalisa a segunda etapa da reação de ACC, com transferência do grupo carboxil ligado à biotina para uma molécula de acetil-CoA (AcCoA), gerando malonil-CoA. CT é composta, em *E. coli*, por duas subunidades (α e β) em uma organização de heterotetrâmero $\alpha_2\beta_2$. CT é codificada pelos genes *accA* e *accD* que, diferentemente de *accBC*, estão em partes opostas do cromossomo bacteriano (JAMES; CRONAN, 2004; MEADES *et al.*, 2010).

Análise estrutural de CT indica domínio da família crotonase nas duas subunidades e domínio de ligação a DNA tipo dedo de zinco na subunidade beta, sendo esse domínio de zinco na cadeia beta exclusivo a ACC de procariotos (Fig. 9) (BILDER *et al.*, 2006). O domínio de ligação a zinco está relacionado a ligação a DNA e, de fato, CT já foi descrita como capaz de ligar DNA, porém de forma não específica (BENSON *et al.*, 2008). Meades e colaboradores (2010) propuseram que CT poderia se ligar de forma específica ao RNA mensageiro (mRNA) de *accA* e *accD*, via domínio de zinco e, dessa forma, regular sua própria transcrição. Segundo os autores, essa interação CT-mRNA seria regulada por Acetil-CoA. Quando a bactéria estivesse na fase estacionária, e com baixa disponibilidade de glucose, os níveis de Acetil-CoA seriam baixos, e atividade de ACC não seria requerida. Desse modo, CT se ligaria a *accAD* mRNA e interromperia sua síntese. Quando as condições voltassem a ser favoráveis, o aumento de glucose no meio levaria ao aumento de Acetil-CoA, que, por sua vez, se ligaria a CT, levando à dissociação da interação CT-mRNA e permitindo a tradução de novas moléculas de ACC (MEADES *et al.*, 2010). Esse modelo, entretanto, foi contestado por Smith e Cronan (2014), que alegam que essa afirmação não é válida *in vivo*, que a ligação de CT ao mRNA seria inespecífica e que a dissociação em resposta aos níveis de acetil-CoA poderia

ser devido apenas a um efeito da alteração das condições iônicas do meio com a adição de 1 mM de acetil-CoA.

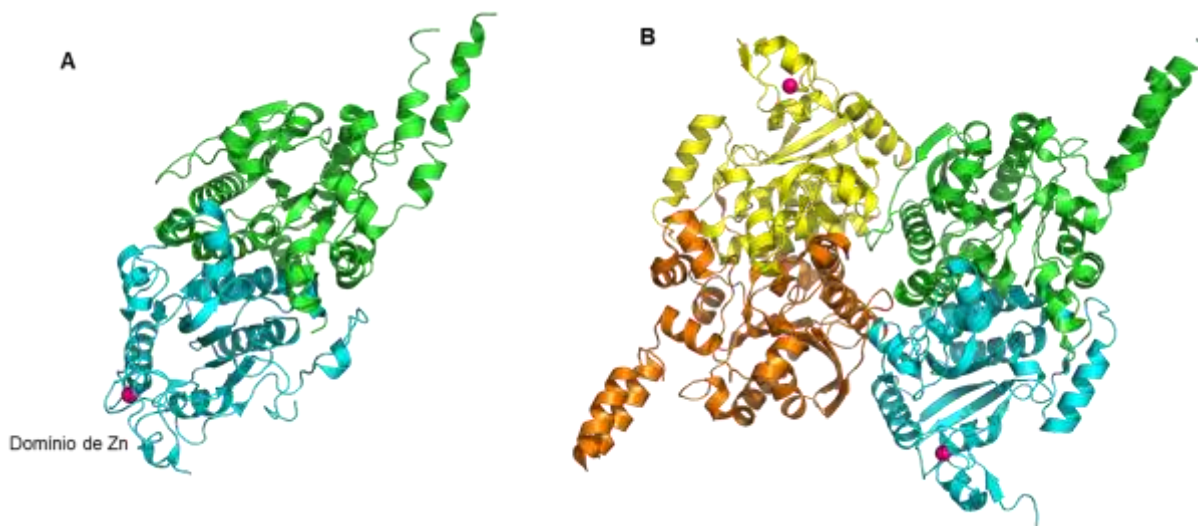


Figura 9 – Estrutura da Carboxiltransferase (CT). (A) Dímero $\alpha\beta$ de CT de *E. coli*, PDB 2F9Y. (B) CT $\alpha 2\beta 2$ de *Staphylococcus aureus*, PDB 2F9I. Subunidades verde e laranja: α -CT; azul e amarela: β -CT. Esferas rosa indicam Zn^{2+} . Figuras geradas no programa Pymol. Fonte: a autora.

1.9. Função e regulação de Acetil-CoA Carboxilase

Em termos de regulação, ACC de mamíferos são as mais bem estudadas. Sabe-se que, nesses organismos, ACC é ativa quando polimerizada (moléculas de alta massa molecular) e regulada por citrato, por acil-ACP de cadeia longa e por fosforilação. As duas isoformas de ACC humanas (hACC1 e hACC2) são reguladas em diferentes níveis. hACC1 e 2 são inativadas por fosforilação por AMPK (proteína quinase AMP dependente) (HARDIE; PAN, 2002), e ativadas por desfosforilação (Fig. 10). hACC também é inibida alostericamente por acil-ACPs de cadeia longa, que se ligam a ACC e levam a sua despolimerização (inativa). Altos níveis de acil-ACPs indicam acúmulo do produto final da via de síntese de ácidos graxos e causa retroinibição. Por outro lado, a transcrição de hACC1 e hACC2 é estimulada por insulina e glicocorticoides (ZHAO *et al.*, 2010). hACC é ainda ativada a nível transcricional pelos níveis de citrato, que, ao se ligar em ACC, estimula sua polimerização, resultando em sua forma ativa (GREGOLIN *et al.*, 1966; WAKIL; STOOPS; JOSHI, 1983; KIM *et al.*, 2010). Citrato é produzido na mitocôndria e

transportado para o citosol, onde, através da enzima citrato liase, é convertido a acetil-CoA, que é o substrato de ACC. Desse modo, altos níveis de citrato estão diretamente relacionados a altos níveis de substrato para ACC. Além desses mecanismos, hACC1 e 2 são ainda ativadas pela proteína MING12, que se liga à hACC e favorece sua polimerização, acarretando um aumento de até 50 vezes na atividade de ACC (KIM *et al.*, 2010). O aumento de atividade de ACC em mamíferos também já foi relatado com a associação de ACC e microsossomos (fragmentos de retículo endoplasmático rearranjados em pequenas vesículas) (WITTERS; FRIEDMAN; BACON, 1981).

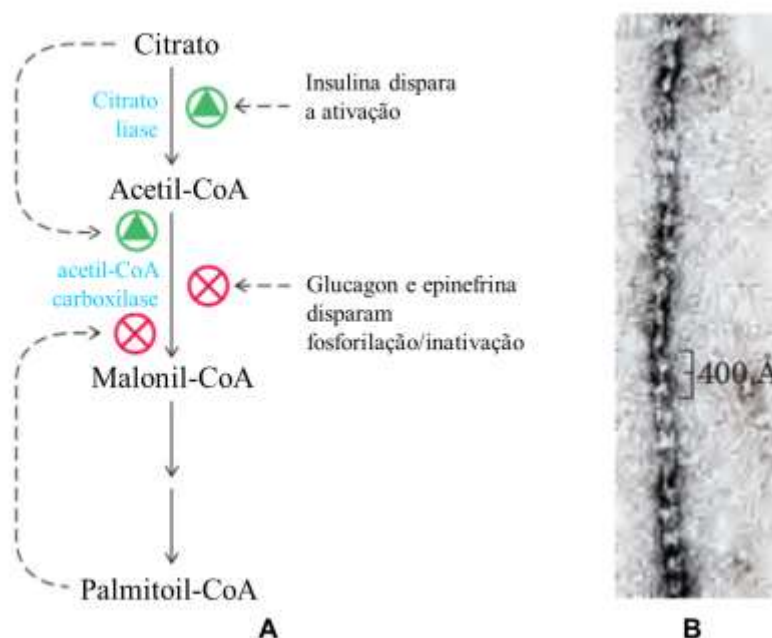


Figura 10 – Regulação da síntese de ácidos graxos de vertebrados. (A) – Regulação alostérica e modificação covalente influenciam o fluxo de precursores para a formação de malonil-CoA. **(B)** – filamentos de acetil-CoA carboxilase (forma ativa desfosforilada) vista por microscopia eletrônica. Fonte: Lehninger, Princípios de Bioquímica, 4ª edição.

Embora a atividade de ACC seja bem estudada em bactérias, pouco se sabe sobre a sua regulação. Davis e Cronan Jr (2001) verificaram que *E. coli* ACC é inibida por Acil-ACP, de forma dose dependente. Eles verificaram inibição de 60-70% da atividade de ACC por acil-ACPs de C6 a C20 e que essa inibição é específica para EcACPs. Esse mecanismo de inibição faz sentido fisiologicamente, uma vez que o acúmulo de Acil-ACPs indica que a sua síntese está maior que a sua

demanda. Uma inibição por esse produto equivale a uma economia de energia e de metabólitos chave (DAVIS; CRONAN JR, 2001; CRONAN JR.; WALDROP, 2002).

Em *E. coli*, a expressão de BCCP e BC é co-regulada. Li e Cronan (1993) verificaram que a adição de um plasmídeo multicópias (20-100) contendo o operon *accBC* com seu promotor nativo levou a um aumento de apenas 2 vezes ou menos na expressão de BC e BCCP, sugerindo uma regulação transcricional desse operon. James e Cronan (2004) verificaram que o acúmulo de BCCP faz com que a região N-terminal da proteína se ligue ao promotor do operon *accBC* e impeça sua transcrição. Dessa forma, a expressão do operon *accBC* em *E. coli* é controlada por BCCP.

Em *E. coli*, a síntese de ácidos graxos está relacionada apenas com a formação de membranas e crescimento celular. Entretanto, em outros organismos, como em actinomicetos, malonil-CoA é utilizado para mais funções do que apenas formação de membranas. Em *Streptomyces coelicolor*, malonil-CoA também serve de substrato para síntese de compostos policetídeos que são metabólitos secundários, quimicamente variados, sintetizados a partir de malonil-CoA (HOPWOOD; SHERMAN, 1990; RODRÍGUEZ *et al.*, 2001). Nesse organismo, assim como em outros actinomicetos, ACC tem uma configuração diferente. No caso de *S. coelicolor*, ACC é formada por uma subunidade α (*S. coelicolor* possui duas cópias - AccA1 ou AccA2 – BC e BCCP fusionadas), uma subunidade β (AccB, equivalente a EcCT) e uma subunidade ϵ (AccE). AccE não é necessário para a função catalítica de ScACC, embora a atividade de ScACC seja menor na ausência de AccE (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001) O gene *accE* está presente em um operon com *accB* em *S. coelicolor* e não possui homólogo em *E. coli*. A proteína contendo AccA2, AccB e AccE parece ser a proteína ACC responsável pela síntese de malonil-CoA em *S. coelicolor* enquanto que o papel de AccA1 permanece indefinido (RODRÍGUEZ *et al.*, 2001).

Além de *S. coelicolor*, *M. tuberculosis* apresenta uma configuração de ACC que difere de *E. coli*. *M. tuberculosis* possui três cópias do gene para a subunidade α (AccA1-3), seis cópias de prováveis subunidades β (AccD1-6) e uma subunidade ϵ (*accE5*). Em *M. tuberculosis* malonil-CoA é utilizado para síntese de membranas de policetídeos e de ácido micólico, que está relacionado à virulência de *M. tuberculosis*. Ácido micólico pertence a uma variedade de ácidos graxos α -alquil β -hidroxi de cadeia muito longa e alta massa molecular, sendo uma marca de

Micobacterias e espécies relacionadas (KOLATTUKUDY *et al.*, 1997). Dado o alto número de cópias das possíveis subunidades de ACC, várias combinações são possíveis. ACCA1-ACCD1 ($\alpha 1\beta 1$) e ACCA2-ACCD2 ($\alpha 2\beta 2$) foram descritas como provavelmente envolvidas com a degradação de ácidos graxos de cadeia ímpar (COLE *et al.*, 1998).

Análises de microarranjo em *M. tuberculosis* revelaram que *accA3*, *accD4*, *accD5* e *accD6* são altamente expressos durante a fase exponencial de crescimento e são, juntamente com *accE5*, reprimidos quando há depleção na disponibilidade de nutrientes (DANIEL *et al.*, 2007). ACCase 6 (AccA3 e AccD6) apresenta preferência por acetil-CoA como substrato, é inibida por AccE5 e parece estar envolvida com a síntese de ácido micólico (DANIEL *et al.*, 2007). ACCase 5 (AccA3 e AccD5) tem preferência por propionil-CoA (5 vezes mais eficiente como PCC) e está envolvida com a síntese de ácidos graxos ramificados a partir de metilmalonil-CoA e com a carboxilação de acil-CoA de cadeia longa, sendo dependente de AccE5 para apresentar atividade máxima (GAGO *et al.*, 2006; BAZET LYONNET *et al.*, 2014). Embora ACCase 5 pareça estar mais relacionada à função de propionil-CoA carboxilase (PCC), a deleção dos genes *accD5* e *accE5* resulta em grande alteração nos *pools* de acetil-CoA e na biossíntese de ácido micólico (BAZET LYONNET *et al.*, 2014). E, por fim, ACCase 4 (AccA3 e AccD4) foi descrita como importante para a carboxilação de ácidos graxos para incorporação no ácido micólico (DANIEL *et al.*, 2007).

O conhecimento da regulação de ACC em *E. coli* pode ser benéfico em diversos aspectos, por se tratar de um organismo modelo, e pode ser utilizado tanto para fins de desenvolvimento de novas drogas, quanto com a finalidade de aplicações biotecnológicas, geração de produtos derivados de ácidos graxos de alto valor agregado e produção de metabólitos secundários (LENNEN; PFLEGER, 2013). *E. coli* é um organismo atrativo para engenharia de produção de ácidos graxos devido a apresentar o sistema ácido graxo sintase do tipo II (FAS II), onde cada componente é codificado por um gene diferente, ao contrário do sistema FAS I que é encontrado na maioria dos eucariotos e em algumas bactérias (WHITE *et al.*, 2005). A vantagem de FAS II é que permite o acesso a intermediários da via de biossíntese de ácidos graxos.

Diversos trabalhos têm sido conduzidos com o intuito de incrementar a produção de biocombustíveis em *E. coli*. Dentre esses trabalhos, há a tentativa em

transformar *E. coli* em um organismo oleaginoso, de forma que possa acumular altos níveis de lipídeos. Para isso, a enzima ACC de *Acinetobacter calcoaceticus* (organismo oleaginoso que possui até 70% de lipídeos em seu peso seco) foi co-expressa em *E. coli* com a enzima málica NADPH dependente (para garantir poder redutor para biossíntese). Essa combinação resultou em um aumento de 5,6 vezes no acúmulo de ácidos graxos (MENG *et al.*, 2010). Para melhorar esse rendimento, diferentes estratégias têm sido adotadas, como por exemplo, a co-expressão de tioesterases, que hidrolisam acil-CoA e acil-ACP, gerando ácidos graxos livres e evitando assim o efeito inibitório dessas moléculas sobre ACC (LENNEN; PFLEGER, 2012).

Outro organismo de interesse é a bactéria *A. brasilense*. *A. brasilense* pertence à classe das α -proteobactérias e é um organismo diazotrófico encontrado em associação com diversas plantas de interesse econômico. As bactérias do gênero *Azospirillum* têm um grande potencial de uso como biofertilizante, devido à capacidade de colonizar raízes de várias espécies de plantas, sua ampla distribuição geográfica e sua eficiência na fixação de nitrogênio *in vitro* (PEDROSA, 1987). Essas bactérias já foram isoladas de raízes de mais de 100 espécies de plantas, podendo também ser aplicadas em raízes de plantas que não apresentam histórico de colonização com *Azospirillum* (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004), apresentando potencial benéfico para a agricultura, podendo influenciar positivamente o crescimento vegetal, o rendimento da safra e o conteúdo de nitrogênio da planta (STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000). Seu uso como biofertilizante já foi aprovado no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para as culturas de milho e trigo.

O interesse de se estudar a regulação de ACC em *A. brasilense* reside no fato de BCCP ter sido encontrada como possível ligante de PII, interação essa que já foi descrita em *A. thaliana*. Em *A. brasilense*, as proteínas PII estão diretamente relacionadas à regulação do processo de fixação biológica de nitrogênio, seja por ativar o sistema NtrC-NtrB ou por regular a atividade da enzima nitrogenase a nível pós traducional via adição/remoção de ADP-ribose, catalisada por DraT e DraG, respectivamente.

Além dos organismos já citados, é importante o estudo da regulação do metabolismo de lipídeos de organismos fototróficos, que são de especial interesse na produção de biocombustíveis, uma vez que contribuem para a captação de CO₂

reduzindo o efeito estufa. Nesse sentido, *S. elongatus* é um excelente candidato, por se tratar de um organismo modelo e de fácil manipulação. A obtenção de respostas quanto à regulação do metabolismo de ácidos graxos nesse organismo pode auxiliar no desenvolvimento de linhas de cianobactérias superprodutoras de biocombustíveis.

2. JUSTIFICATIVA

Proteínas PII são amplamente distribuídas em diversos organismos. Entre suas funções conhecidas, encontra-se principalmente a regulação do metabolismo de nitrogênio, sendo que sua atuação se dá por interação proteína-proteína em resposta a efetores, como ATP, ADP e 2-OG. Dessa forma, proteínas PII poderiam atuar sensoriando o estado energético da célula através da relação ATP/ADP e sinalizando o suprimento de nitrogênio a partir da concentração de 2-OG. Dados obtidos *in vitro* com *A. brasilense* indicam que a resposta de PII se dá principalmente pela concentração de 2-OG (GERHARDT *et al.*, 2012), sofrendo pouca influência da relação ATP/ADP, que parece ser altamente tamponada *in vivo* (nas condições testadas, em baixos níveis de nitrogênio disponível). Os níveis de 2-OG têm potencial de sinalizar deficiência de nitrogênio e também suficiência de carbono celular (por participar de vias centrais do metabolismo de carbono). Assim, surgiu a hipótese de que proteínas PII podem sensoriar a relação C/N celular, integrando o estado de nitrogênio (glutamina e 2-OG), com o de carbono (2-OG) (HUERGO, CHANDRA e MERRICK, 2012; HUERGO; DIXON, 2015). Em 2010, foi reportada a interação de PII com a subunidade BCCP da enzima ACCase de *A. thaliana* (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010), reforçando ainda mais a hipótese de envolvimento de PII no metabolismo de carbono. Entretanto, apenas essa interação foi reportada relacionando proteínas PII com metabolismo de carbono. Mas existem outras evidências (como análises de vizinhança gênica) de que proteínas PII possam ter outras funções não relacionadas apenas ao metabolismo de nitrogênio, o que torna necessário um estudo mais aprofundado das funções dessas proteínas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo detectar novas proteínas ligantes da proteína GlnZ de *Azospirillum brasilense*, buscando potenciais alvos e, desta maneira, compreender melhor o papel das proteínas PII no metabolismo de *A. brasilense*.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Identificar novas proteínas ligantes de GlnZ de *A. brasilense* em resposta à variação dos efetores ATP, ADP e 2-OG
- ✓ Relacionar possíveis funções de PII com as proteínas alvo identificadas
- ✓ Clonar os genes das proteínas identificadas nos ensaios de interação e testar *in vitro* o efeito de GlnZ sobre essas proteínas
- ✓ Caracterizar a interação PII-ACC por ensaios cinéticos a fim de avaliar o efeito de efetores e modificação pós-traducional de PII na atividade de ACC

4. METODOLOGIA

4.1. Bactérias e Plasmídeos

As bactérias e plasmídeos utilizados nesse trabalho são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Estirpes de bactérias e plasmídeos

<i>Escherichia coli</i>	Característica	Referência
BL21 (λDE3)	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ <i>clts</i> 857 <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5-T7</i> gene 1)	Sambrook; Fritsch,; Maniatis, (1989)
DH10B	Sm ^r , F'[<i>proAB</i> ⁺ <i>lacZ</i> ΔM15]	Sambrook; Fritsch,; Maniatis, (1989)
RB9060	Δ <i>glnB</i> 2306 Amp ^r Lac ⁻ GlnC derivative of RB9016	Bueno; Pahel; Magasanik (1985)
<i>Azospirillum brasilense</i>		
FP2	Nal ^r Sm ^r Estirpe selvagem, SP7 Nif ⁺	Pedrosa e Yates (1984)
2812	Nal ^r Sm ^r Km ^r Nif ⁻ <i>glnB</i> ::km <i>glnZ</i> ::Ω	de Zamaroczy <i>et al.</i> , (1998)
Plasmídeo	Características	Referência
pLHDK7PZHis	Cm ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> His-Glnz em pDK7	Huergo <i>et al.</i> , (2006)
pLMA-MLV1	Km ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> GlnB 6xHis-tag no pet28a	Huergo <i>et al.</i> , (2007)
pEGPet29GlnZFLAG	Km ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> GlnZ 3xFLAG tag N-terminal no pet 29a	Este trabalho
pLHAbBCCPpeT29a	Km ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> BCCP 6xHis-tag N-terminal no pet 28a	Luciano Huergo
pLHAbBCCPpt	Amp ^r . Expressa <i>A. brasilense</i> BCCP nativa no PT7-7	Luciano Huergo
pMSA4	Km ^r (pET28a). Expressa <i>A. brasilense</i> GlnZ nativa	Araújo <i>et al.</i> , (2004)
pLH25PET	Km ^r (pET28a). Expressa <i>A. brasilense</i> GlnB nativa	Huergo <i>et al.</i> , (2005)
pLHDK7PZHis	Cm ^r Expressa Expressa <i>A. brasilense</i> His-Glnz em pDK7	Huergo <i>et al.</i> , (2006)
pET16baccAD	Amp ^r (pET16b). Expressa <i>E. coli</i> <i>accAD</i> com 6xHis-tag N-terminal de AccA	Soriano <i>et al.</i> , (2006)
pET16baccC	Amp ^r (pET16b). Expressa <i>E. coli</i> <i>accC</i> com 6xHis-tag N-terminal de AccC	Soriano <i>et al.</i> , (2006)
pCY216	Cm ^r . Expressa <i>E. coli</i> BirA	Chapman-Smith <i>et al.</i> ,

	nativa, com promotor araBAD	(1994)
pET21a-BirA	Amp ^r Expressa BirA <i>E. coli</i> 6xHis tag C-terminal	Howarth <i>et al.</i> , (2005)
pJT25	Amp ^r (pT7-7). Expressa <i>E. coli</i> GlnK nativa	Radchenko <i>et al.</i> , (2010)
pTRPETHisGlnK	Km ^r (pET28a). Expressa <i>E. coli</i> GlnK com 6xHis-tag N-terminal	Rodrigues <i>et al.</i> , (2014)
pTRPETBCCPn	Km ^r (pET-29a). Expressa <i>E. coli</i> BCCP nativa	Rodrigues <i>et al.</i> , (2014)
pEGPETGlnB	Km ^r (pET-29a). Expressa <i>E. coli</i> GlnB nativa	Este trabalho
pTRPETHisGlnB	Km ^r (pET28a). Expressa <i>E. coli</i> GlnB com 6xHis-tag N-terminal	Gerhardt <i>et al.</i> , (2015)
pASK-IBASeGlnB	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa GlnB de <i>S. elongatus</i> nativa	Karl Forchhammer
pGH1	Km ^r (pET-29a). Expressa GlnD 6xHis-tag de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Couto, 2005
pASK-IBA3plus	Amp ^r . Plasmídeo de expressão, promotor <i>tet</i> . Indução da expressão: anidrotetraciclina (200 µg/L)	IBA Lifesciences
pASK-IBASeGlnB_Y51A	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnB Y51A, promotor <i>tet</i> .	Este trabalho
pASK-IBASeGlnB_S49E	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnB S49E, promotor <i>tet</i> .	Este trabalho
pASK-IBASeGlnB_E54A	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnB E54F, promotor <i>tet</i> .	Este trabalho
pASK-IBASeGlnB_R45A	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnB R45A, promotor <i>tet</i> .	Karl Forchhammer
pASK-IBASeGlnB_R47A	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnB R47A, promotor <i>tet</i> .	Karl Forchhammer
pASK-IBASeGlnB_S49D	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnB S49D, promotor <i>tet</i> .	Karl Forchhammer
pASK-IBASeGlnB_S49G	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnB S49G, promotor <i>tet</i> .	Karl Forchhammer
pASK-IBASeGlnB_T52A	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnB T52A, promotor <i>tet</i> .	Karl Forchhammer
pASK-IBASeGlnB_E85A	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnB E85A, promotor <i>tet</i> .	Karl Forchhammer
pASK-IBASeGlnB_I86N	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnB I86N, promotor <i>tet</i> .	Karl Forchhammer
pASK-IBASeGlnB_R103H	Amp ^r . pASK-IBA3. Expressa SeGlnBR103H, promotor <i>tet</i> .	Karl Forchhammer
pMSA4 Q42HS52VS54D	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ Q22HS52VS54D de <i>A. brasilense</i> promotor T7	Moure <i>et al.</i> , (2013)
pGlnB Δ42-54	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnB del loop T (Δ42-	Moure <i>et al.</i> , (2013)

	54) de <i>A. brasilense</i> promotor T7	
pMSA4 S52VS54D	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnZ S52VS54D de <i>A. brasilense</i> promotor T7	Moure <i>et al.</i> , (2013)
pLH25 V52SD54S	Km ^r . Expressa a proteína mutante GlnB V52SD54S de <i>A. brasilense</i> promotor T7	Maria Isabel Stets

Fonte: a autora.

4.2. Meios de Cultura

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas a 37°C, sendo utilizados os meios Luria-Broth (LB) ou LA com as seguintes composições:

Luria-Broth ou LB (SAMBROOK *et al.*, 1989):

Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Triptona	10 g/L

LA (SAMBROOK *et al.*, 1989): meio LB + 15 g/L de ágar.

As estirpes de *A. brasilense* foram cultivadas a 30°C em meio NFb lactato. A composição e o preparo do meio NFb estão descritos abaixo.

NFB lactato

MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻¹ g/L
NaCl	1,0 x 10 ⁻¹ g/L
CaCl ₂	2,0 x 10 ⁻² g/L
Ácido nitrilo-triacético	5,6 x 10 ⁻² g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0 x 10 ⁻² g/L
Lactato de sódio	5,0 g/L
Biotina	1,0 x 10 ⁻⁴ g/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	2,0 x 10 ⁻³ g/L
MnSO ₄ .H ₂ O	2,35 x 10 ⁻³ g/L

H ₃ BO ₃	2,8 x 10 ⁻³ g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0 x 10 ⁻⁵ g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,4 x 10 ⁻⁴ g/L
pH	6,5

A fonte de nitrogênio utilizada foi NH₄Cl 20 mM. As soluções de fosfatos (K₂HPO₄ 17,8 g/L e KH₂PO₄ 159,5 g/L) e cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionadas frias ao meio de cultivo no momento do uso. O meio NFb lactato sólido foi obtido adicionando-se ágar bacteriológico na concentração de 15 g/L ao meio líquido.

4.3. Antibióticos

Os antibióticos empregados e suas respectivas concentrações finais foram: canamicina (Km) 100 µg/mL, ácido nalidíxico (Nal) 20 µg/mL, cloranfenicol (Cm) 30 µg/mL, estreptomicina (Sm) 20 µg/mL e Ampicilina (Amp) 250 µg/mL para *E. coli* ou 80 µg/mL para *A. brasilense*. As soluções estoque dos antibióticos foram preparadas como descrito por SAMBROOK *et al.*, 1989 e mantidas a 4°C.

4.4. Transformação Bacteriana

4.4.1. Por choque térmico

Células BL21 (λDE3) ou DH10B foram crescidos durante a noite em 5 mL de meio LB. Na manhã seguinte as culturas foram diluídas em 250 mL de meio LB (1:100 v/v). A cultura foi então crescida até densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) entre 0,3 e 0,4. As culturas foram transferidas para tubos de centrifugação de 400 mL e mantidas em gelo por 30 minutos, sendo em seguida centrifugadas por 10 minutos a 800 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram

ressuspensas em 30 mL de solução gelada de CaCl_2 0,1 M e mantidas em gelo por 30-60 minutos. As células foram então centrifugadas por 10 minutos a $800 \times g$ a 4°C , e as células sedimentadas foram ressuspensas em 8 mL de CaCl_2 0,1 M e glicerol 15% (solução gelada). As células foram separadas em alíquotas de 200 μL e armazenadas a -80°C .

Para o uso, as alíquotas de células foram mantidas no gelo por 30 minutos. O DNA plasmidial de interesse foi adicionado à mistura de células, mantendo-se no gelo por 30 minutos, seguido de banho a 42°C por 2 minutos e novamente banho de gelo por 2 minutos, seguido da adição de 1 mL de LB. As células foram mantidas a 37°C por 40 minutos, para recuperação. Alíquotas de 100 μL foram plaqueadas em meio LA contendo antibióticos adequados.

4.4.2. Por eletroporação

Células BL21 (λDE3) ou DH10B foram crescidos durante a noite em 5 mL de meio LB. Na manhã seguinte as culturas foram diluídas em 500 mL de meio LB (1:200 v/v). A cultura foi crescida a 37°C , sob agitação, até DO_{600} entre 0,5 e 0,7. A cultura foi mantida em gelo por 10-15 minutos e então foi centrifugada por 20 minutos a $560 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi ressuspensão em 500 mL de H_2O ultrapura gelada e novamente centrifugado por 20 minutos a $560 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi novamente ressuspensão em 500 mL de H_2O ultrapura gelada e centrifugado por 20 minutos a $560 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram ressuspensas em 40 mL de glicerol 10% (v/v) gelado e transferido para tubo plástico de 50 mL e então centrifugado por 10 minutos a $1.430 \times g$ a 4°C . O sedimento celular obtido após a centrifugação foi ressuspensão em 500 μL de glicerol 15% (v/v) gelado. Foram feitas alíquotas de 50 μL em tubos plásticos de 1,5 mL, que foram armazenadas a -80°C .

Para o uso, as alíquotas de células foram mantidas no gelo por 10 minutos. Aproximadamente 50 ng de DNA foram adicionados à 50 μL de célula eletrocompetente e transferidas para cubeta de eletroporação de 0,2 cm de distância entre os pólos, previamente esterilizada por luz ultravioleta (UV). As células foram

submetidas a um único pulso elétrico de aproximadamente 4 kΩ, 15 kV/cm (voltagem aplicada/distância entre os eletrodos) por 9 milisegundos. Imediatamente após o pulso elétrico, foi adicionado 1 mL de meio LB à cubeta de eletroporação. A suspensão de células foi transferida para um tubo estéril e incubada a 37°C por 60 minutos para recuperação. Alíquotas das células eletroporadas foram plaqueadas em meio LA contendo antibióticos adequados.

4.5. Amplificação de DNA através de PCR

Para amplificar DNA foi utilizado o sistema de reação em cadeia da polimerase (PCR) (KOCHER e WILSON, 1991). Os iniciadores (*primers*) utilizados foram sintetizados pela empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*). A reação foi composta por: tampão de PCR (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, aproximadamente 20 ng de DNA molde e 1 U de Taq DNA polimerase em 25 µL de volume final de reação. Os parâmetros utilizados variaram de acordo com o DNA a ser amplificado.

4.6. Construção do plasmídeo pEGPet29GlnZ-FLAG

O gene *glnZ* de *A. brasilense* foi sintetizado pela empresa Eurofins, utilizando como base o genoma de *A. brasilense* sp245 (GenBank: X92496.1), com otimização de códons para expressão em *E. coli* BL21 (λDE3), conforme mostrado a seguir (gene – preto, proteína – verde) e adição de cauda 3x FLAG (rosa) (Fig. 11A). Ao início do gene foi adicionado um sítio de restrição para enzima *NdeI* e ao final, após o códon de parada, um sítio para a enzima *EcoRI*. Para clonagem, foi utilizado o método de Gibson (GIBSON *et al.*, 2009), que consiste na utilização de *primers* complementares tanto ao vetor quanto ao gene a ser clonado, tendo esses *primers* aproximadamente 60 nucleotídeos (30 complementares ao vetor e 30

complementares ao gene). Foram sintetizados *primers* complementares tanto ao vetor pET-29a quanto ao gene de GlnZ (fig. 11B: pET-29a – azul; *glnZ* - preto).



Figura 11 - Construção do plasmídeo pEGPet29GlnZ-FLAG. A – pET-29a + GlnZ-FLAG. Sequência do vetor pET-29a é mostrado em azul, do gene em preto, 3 x FLAG em rosa e sequência da proteína em verde. Sequências da região de anelamento dos *primers* são apresentados sublinhados. B – *Primers* utilizados para clonagem por reação de Gibson. Regiões complementares ao vetor são mostradas em azul e complementares ao gene, em preto. Fonte: a autora.

O gene foi amplificado com os *primers* apresentados na figura 11B e o produto de PCR foi purificado a partir de eletroforese em gel de agarose (TAE) 1% (p/v). O vetor pET-29a foi cortado com a enzima *NdeI* e também purificado através de gel de agarose 1%, usando kits para purificação. Para a reação de Gibson, foram utilizados 100 ng de plasmídeo e excesso de inserto (proporção molar 1:5 plasmídeos:inserto) (a reação foi preparada e mantida em gelo até o início da reação). O volume de DNA (vetor + inserto) foi ajustado para 5 µL e adicionado a 15 µL de Master Mix (Preparo do tampões para reação de Gibson – tabelas 3 e 4). A reação foi incubada em termociclador, pré-aquecido, por 1 hora a 50°C. 1,5 µL da reação foi transformado em células DH10B por eletroporação. Após o pulso elétrico, as células foram ressuspensas em meio LB pré-aquecido a 37°C e mantidas por 1,5 h em recuperação em estufa a 37°C. Foram plaqueados 1 mL em meio ágar adicionado de canamicina. As placas foram mantidas em estufa a 37°C .

Tabela 3 - Preparo do tampão isotermal de reação 5X

5X final	Quantidade	Concentração solução estoque
25% PEG-8000	0,75 g	pó
500 mM Tris-HCl pH 7,5	1,5 mL	1M
50 mM MgCl ₂	75 µL	2 M
50 mM DTT	150 µL	1 M
1 mM dATP	30 µL	100 mM
1 mM dTTP	30 µL	100 mM
1 mM dCTP	30 µL	100 mM
1 mM dGTP	30 µL	100 mM
5 mM NAD ⁺	300 µL	50 mM
H ₂ O	q.s.p 3 mL (volume final)	

Fonte: a autora.

Tabela 4 - Preparo do Master Mix para reação de Gibson

1,33X	Quantidade
5X tampão isotermal	100 µL
T5 exonuclease ^a 1,0 U/µL	2 µL
Phusion DNA pol ^a 2 U/µL	6,25 µL
Taq DNA ligase ^a 40 U/µL	50 µL
H ₂ O	216,75 µL (375 µL volume final)

Fonte: a autora.

^a Enzimas – NEB

Master Mix foi aliquotado (25 aliquotas de 15 µL) e armazenado a -20°C.

4.7. Construção do plasmídeo pEGPETGlnB

O gene *glnB* de *E. coli* foi sintetizado pela empresa Eurofins, utilizando como base o genoma de *E. coli* K12, com otimização de códons para expressão em *E. coli* BL21 (ΔDE3), conforme mostrado na figura 12 (gene – preto, proteína – verde). O gene foi posteriormente digerido com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* e ligado ao plasmídeo pET-29a (digerido com as mesmas enzimas). O produto da expressão desse plasmídeo é a proteína EcGlnB nativa.

```

NdeI M  K  K  I  D  A  I  I  K  P  F  K  L  D  D
CATATG AAG AAA ATT GAC GCC ATC ATC AAA CCG TTC AAA CTG GAT GAT
  V  R  E  A  L  A  E  V  G  I  T  G  M  T  V
GTA CGT GAA GCC TTA GCA GAA GTG GGG ATT ACC GGT ATG ACG GTA
  T  E  V  K  G  F  G  R  Q  K  G  H  T  E  L  Y
ACC GAA GTG AAA GGC TTT GGT CGC CAG AAA GGG CAT ACC GAA TTG TAT
  R  G  A  E  Y  M  V  D  F  L  P  K  V  K  I  E
CGT GGA GCG GAA TAC ATG GTC GAC TTT CTG CCG AAA GTG AAG ATT GAG
  I  V  V  P  D  D  I  V  D  T  C  V  D  T  I  I
ATC GTT GTT CCA GAT GAC ATC GTC GAC ACT TGC GTC GAT ACC ATC ATT
  R  T  A  Q  T  G  K  I  G  D  G  K  I  F  V  F
CGC ACA GCT CAA ACG GGC AAA ATT GGC GAT GGC AAA ATC TTC GTG TTT
  D  V  A  R  V  I  R  I  R  T  G  E  E  D  D
GAT GTT GCA CGT GTG ATT CGG ATT CGC ACT GGT GAA GAG GAT GAT
  A  A  I  -  EcoRI
GCG GCG ATT TAAGAATTC

```

Figura 12 - **Construção do plasmídeo pEGPETGlnB**. Gene é mostrado em preto e sequência da proteína em verde. Sítios de restrição são mostrados em azul (*NdeI*) e vermelho (*EcoRI*). Fonte: a autora.

4.8. Construção dos plasmídeos pASK-IBASeGlnB49E, pASK-IBASeGlnB51A e pASK-IBASeGlnB54A

Os plasmídeos pASK-IBASeGlnB_S49E, pASK-IBASeGlnB_Y51A e pASK-IBASeGlnB_E54A foram construídos através de síntese de gene pela empresa IDT e clonados através do método de Gibson (GIBSON *et al.*, 2009) no vetor pASK-IBA3plus digerido com as enzimas *NcoI* e *SacII*.

4.9. Eletroforese e purificação de fragmentos de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose horizontal conforme descrito por SAMBROOK *et al* (1989). O DNA foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta após tratamento com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e o perfil eletroforético foi registrado em transiluminador equipado com câmera CCD. Para purificação de fragmentos em gel de agarose, a eletroforese foi conduzida em agarose de baixo ponto de fusão e as bandas de interesse foram cortadas sob iluminação com luz ultravioleta. O fragmento de DNA foi extraído do gel através de *kits* comerciais, seguindo recomendação dos fabricantes.

4.10. Purificação de DNA plasmidial

A purificação de DNA plasmidial em *E. coli* DH10B foi realizado segundo o método de lise alcalina (SAMBROOK *et al.*, 1989). Um e meio mililitros de uma cultura de células contendo o plasmídeo de interesse, incubada durante a noite em meio LB a 37°C, foram centrifugados a 13.000 rpm por 60 segundos (centrífuga Eppendorf MiniSpin). As células precipitadas foram ressuspensas em tampão GET (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0) e a lise celular efetuada com a adição de 1% (p/v) SDS e 0,2 M NaOH. DNA cromossomal e proteínas foram precipitados com Kcaf (acetato de potássio 3 M pH 4,8 e ácido fórmico 1,8 mol/L). Após incubação por 10 minutos em banho de gelo, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm (MiniSpin Eppendorf). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a ele foram adicionados 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a amostra foi agitada por inversão e centrifugada por 10 minutos a 13000 rpm (MiniSpin Eppendorf). A fase aquosa foi coletada e adicionada de 2 volumes de etanol 96% com a finalidade de precipitar o DNA plasmidial. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm (MiniSpin Eppendorf) por 15 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 80% (v/v), centrifugada a 13.000 rpm

(MiniSpin Eppendorf) por 15 minutos e seco a vácuo ou em bancada e depois ressuspensão em água.

4.11. Dosagem de proteína

As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), segundo especificações que acompanham o Reagente de Bradford (Biorad). As reações continham 20 µL de amostra e 180 µL de reagente e foram preparadas em microplacas de 96 poços. Para curva padrão, foi utilizada albumina de soro bovino (BSA) em concentrações de 20 a 100 µg/mL. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas, em comprimento de ondas de 595 nm.

4.12. Eletroforese de proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Eletroforese de proteínas, sob condições desnaturantes SDS-PAGE, foram realizadas em gel de poliacrilamida de 7,5 a 15%, como descrito por LAEMMLI (1970). As soluções utilizadas foram preparadas conforme descrito por Huergo (2006).

As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo recomendação do fabricante (Biorad). As corridas foram realizadas a 100-200 V em tampão de corrida 1X por 50-120 minutos. Após a corrida o gel foi corado (Coomassie Blue ou coloração com prata), ou transferido para membranas (*western blot*), dependendo do ensaio.

4.13. Expressão das proteínas His-GlnZ, His-GlnB e GlnZ-FLAG

Para a expressão das proteínas de interesse, *E. coli* BL21 (λ DE3) transformada com o plasmídeo da proteína a ser expressa, foi cultivada durante a noite em 20 mL de meio LB suplementado com o antibiótico adequado, a 37°C. Esse pré-inóculo foi então vertido em 400 mL de LB, contendo 40 mM de NH_4Cl e antibiótico, sendo cultivado a 37°C até DO_{600} 0,5-0,7. Foi então adicionado 0,5 mM de IPTG e mantido a 37 °C por 3 horas. Após esse tempo, as células foram mantidas em gelo por 30 minutos e depois coletadas por centrifugação (5 minutos a 2.240 x g). As células precipitadas foram transferidas para tubo plástico de 50 mL e congeladas a -20°C até o momento do uso.

4.14. Ensaio de interação de AbGlnZ-His com extrato de *A. brasilense* 2812

4.14.1. Cultivo de célula de *A. brasilense* 2812

As estirpes de *A. brasilense* 2812 (genoma com deleção dos genes *glnB* e *glnZ*) foram cultivadas a 30°C em 800 mL de meio NFb lactato (item 4.2) contendo antibióticos adequados e NH_4Cl 20 mM como fonte de nitrogênio. As células foram cultivadas por aproximadamente 28 horas e em seguida coletadas por centrifugação (5000 rpm, 15 minutos a 4°C). O *pellet* celular foi armazenado a -20° C até sua utilização nos ensaios de interação.

4.14.2. Ensaio de interação

Os ensaios de interação foram realizados utilizando diferentes composições de tampões para interação (TI) e eluição (TE), variando quanto às combinações dos efetores ATP, ADP e 2-OG, simulando concentrações e alterações fisiológicas

desses efetores. Nos ensaios de interação iniciais foram utilizadas duas colunas cromatográficas HiTrap Chelating em paralelo (Coluna 1 – GlnZ; coluna 2 – Controle Ct) (fig. 13), equilibradas com tampão de lavagem. Para a coluna 1, células de *E. coli* BL21 (λ DE3) contendo o plasmídeo pLHDK7PZHis (AbGlnZ-His) foram crescidas como descrito no item 4.13. As células foram ressuspensas em tampão de sonicação (TS - Tris-HCl 50 mM pH 8,0; KCl 100 mM) e a suspensão celular foi sonicada em banho de gelo (15 ciclos de 15 segundos com 15 segundos de intervalo) e centrifugada (20.000 x g, 30 minutos a 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado, adicionado o efector a ser avaliado (1 mM de ATP ou 1 mM de ADP ou 1 mM de ATP + 1,5 mM de 2-OG, conforme condição a ser testada) e 5 mM de MgCl₂ e injetado na coluna 1, previamente equilibrada com tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; KCl 100 mM; imidazol 20 mM), com auxílio de bomba peristáltica. A coluna 1 foi então lavada com 20 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM e imidazol 50 mM. A partir desse ponto, todas as etapas foram realizadas para as colunas 1 e 2 em paralelo (a coluna 2 foi apenas previamente equilibrada com tampão de lavagem, sem adição de extrato de His-GlnZ). Ambas colunas foram equilibradas com 5 mL de tampão de interação (TI - Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, imidazol 20 mM, 5 mM de MgCl₂ e efector ATP, ADP e/ou 2-OG), seguido da injeção do extrato de Ab2812 (sonicado em tampão de interação). As colunas foram lavadas com 20 mL de TI, tendo sido coletadas as duas últimas frações de lavagem para análise (frações L1 e L2, Controle – Ct – ou GlnZ). A eluição foi realizada com 5 mL de tampão de eluição contendo efetores (1 mM de ATP + 1,5 mM de 2-OG/ 1 mM de ADP + 1,5 mM de 2-OG/ 1 mM de ADP/ 1 mM de ATP), sendo coletadas frações de 1 mL denominadas E1-5 (Ct ou GlnZ). Em seguida, as colunas foram lavadas com 5 mL de tampão contendo 500 mM de imidazol (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, Imidazol 500 mM) para remoção de todas as proteínas ligadas à resina. Frações de 1 mL foram coletadas e denominadas Im1-2 (Ct ou GlnZ). Todas as frações coletadas foram quantificadas (item 4.11) e aplicadas em gel SDS-PAGE conforme descrito em 4.12.

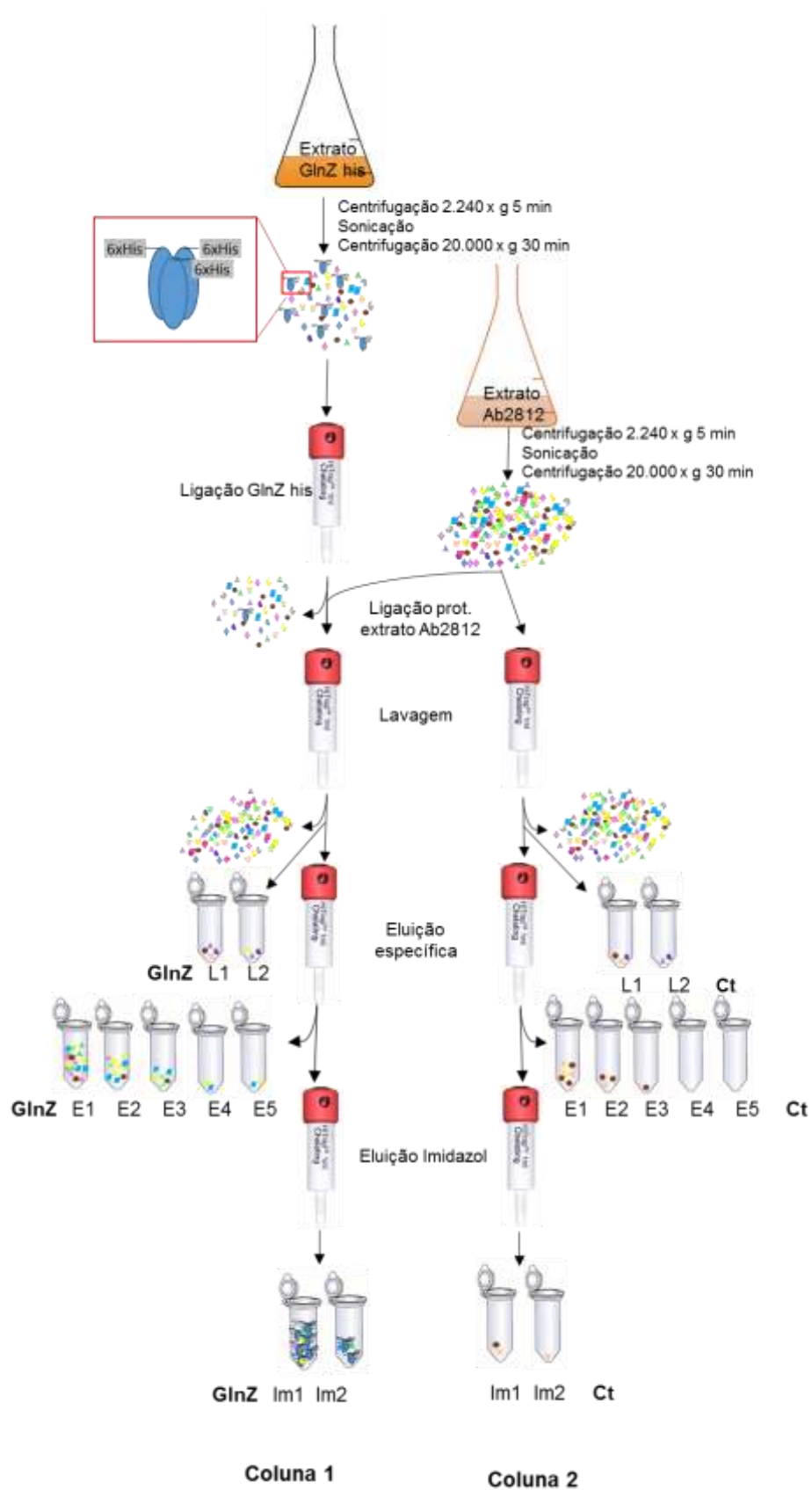


Figura 13 - Esquema do ensaio de interação de His-GlnZ com o extrato de *A. brasilense* 2812.
Fonte: a autora.

Nos ensaios de interação posteriores, além da coluna HiTraP *Chelating*, foi utilizada a coluna Protino Ni-IDA 1000 (Macherey-Nagel) 1 mL. O protocolo utilizado foi o mesmo que o utilizado para HiTrap *Chelating*, com exceção da bomba peristáltica (Protino Ni-IDA 1000 é uma coluna de fluxo por gravidade). Além disso, nos ensaios realizados com HiTrap *Chelating* e Protino Ni-IDA 1000 em paralelo, o extrato de Ab2812 foi primeiramente passado na coluna controle a fim de remover proteínas que interagissem com a coluna e depois passado numa segunda coluna pré-carregada com His-GlnZ e equilibrada com TI. Em seguida o ensaio prosseguiu conforme descrito acima (Fig. 13).

4.15. Ensaio de interação de AbGlnZ-FLAG com extrato de *A. brasilense* 2812

Foram realizados ensaios de interação utilizando a proteína GlnZ-FLAG, a fim de se obter um ensaio com menos ligantes inespecíficos (quando comparado à coluna HiTrap). Para esses ensaios, foi utilizada a resina magnética anti-FLAG (ANTI-FLAG M2 Magnetic Beads, n° catálogo M8823, Sigma). Trezentos microlitros de resina foram lavados com tampão de sonicação (TS –Tris-HCl 50 mM pH 8,0; KCl 100 mM) (300 µL para o controle e 300 µL para GlnZ). Para a condição controle, extrato celular de Ab2812 foi adicionado aos 300 µL de resina (controle) em tampão de interação (TI) contendo 1 mM de ATP e foi incubado por 30 minutos a temperatura ambiente para remoção de proteínas com ligação inespecífica à resina enquanto que na condição GlnZ, extrato de *E. coli* contendo GlnZ-FLAG foi incubado em 300 µL de resina com TI por 30 minutos a temperatura ambiente (fig. 14).

Em seguida, a resina GlnZ foi lavada e o extrato pré-incubado na resina controle foi transferido para a resina GlnZ e incubado por mais 30 minutos. Após esses tempos, ambas resinas foram lavadas seis vezes com 500 µL de TI, sendo que em cada lavagem foi coletada gerando as frações L 1-6 controle (Ct) ou GlnZ. A eluição foi realizada com duas lavagens com 500 µL de tampão de eluição (TE) contendo 1 mM de ATP e 1,5 mM de 2-OG (frações de eluição específica - E1-2, Ct ou GlnZ). Para a remoção de GlnZ-FLAG, a resina foi incubada 5 minutos a temperatura ambiente com 500 µL de TS contendo 0,2 µg/µL de peptídeo 3X FLAG

(gentilmente cedido pela professora Vanete Thomaz Soccol) gerando as frações Peptídeo (P) Ct ou GlnZ (Fig. 14). A resina foi regenerada com incubação por 20 minutos com glicina 0,1 M pH 3,0. Em seguida, a resina foi ressuspensa em solução de 50% glicerol (v/v) e armazenada a -20°C.

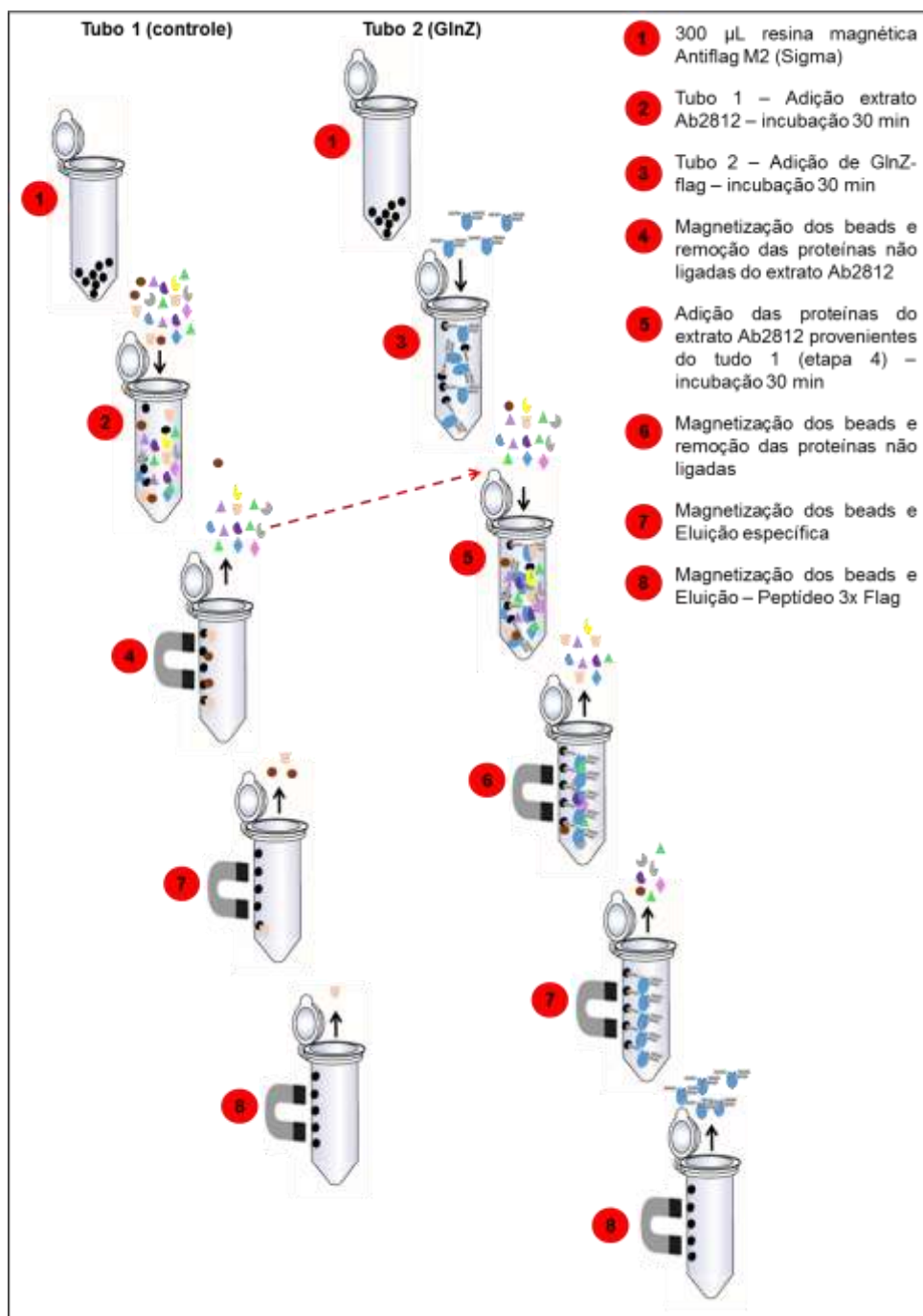


Figura 14 – Esquema do ensaio de interação utilizando resina magnética anti-FLAG M2. Fonte: a autora.

4.16. *Western blot* de proteínas biotiniladas

As proteínas obtidas nos ensaios de interação (4.14 e 4.15) foram analisadas por *western blot* para verificar a presença de proteínas biotiniladas.

Após a eletroforese desnaturante, o gel foi equilibrado em tampão cátodo (C – 0,025M Tris pH10; 20% metanol; 0,04M ácido capróico). A membrana de PVDF (Hybond ECL – GE Healthcare) foi previamente ativada em metanol, lavada em água destilada e equilibrada em solução A2 (0,025M Tris pH10; 20% metanol). O sistema foi montado num aparato de transferência semi-seco. A placa do ânodo foi inicialmente coberta com 3 camadas de papel filtro previamente imersas em solução A1 (0,3 M Tris pH10; 20% metanol). Uma camada de papel filtro contendo solução A2 foi colocada no sistema, seguido da membrana de PVDF previamente imersa no solução A2. O gel foi, então, colocado sobre a membrana (com cuidado para evitar bolhas de ar no sistema). Três camadas de papel filtro contendo solução C (0,025 M Tris pH 10; 20% metanol; 0,04 M ácido capróico) foram colocadas sobre o gel. Um bastão de vidro foi utilizado para comprimir o sistema de transferência e expelir eventuais bolhas de ar. A placa do catodo foi colocada sobre as folhas de papel filtro, o sistema foi conectado a uma fonte de eletroforese a 80 mA por 1 hora. A transferência foi avaliada utilizando um marcador de proteína pré-corado (Rainbow-Invitrogen).

Após a transferência, a membrana foi bloqueada com TBS-T (Tris-HCl pH 7,6 20 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1%) + 0,3% Tween 20 por 40 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com TBS-T + 0,05% Tween 20 e 1:20000 Streptavidina-HPR (Sigma) por 40 minutos. Após esse tempo, a membrana passou por três lavagens de 5 minutos com TBS-T e foi submetida à etapa de revelação utilizando o sistema ECL (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Os sinais foram capturados fotograficamente, utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

4.17. Identificação de proteínas por MALDI-TOF/MS

A identificação de proteínas por MALDI-TOF/MS foi realizada de acordo com Shevchenko e colaboradores (1996) com modificações. As bandas consideradas diferenciais entre as condições de eluição específica e controle (itens 4.14 e 4.15) foram extraídas do gel SDS-PAGE e descoradas em tubos de plástico por sucessivas lavagens com uma solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e 50% de acetonitrila. Em seguida, os fragmentos foram desidratados com acetonitrila 100%. Para digestão, os tubos foram mantidos em gelo com solução de tripsina 15 ng/ μ L em tampão bicarbonato de amônio 40 mM pH 8 e acetonitrila 10% durante 30 minutos e, em seguida, este sistema foi incubado durante 16 horas a 37°C. Um microlitro do sistema de digestão foi misturado com 1 μ L de uma solução de acetonitrila 50% (v/v) e ácido trifluoracético 0,1% (v/v) saturada com a matriz HCCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico). As amostras foram aplicadas em uma placa de MALDI até cristalizarem. Os espectros foram adquiridos usando um espectrômetro MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A aquisição das massas foi realizada no modo positivo utilizando voltagem de 20 kV. A lista de picos foi criada usando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). A identificação das proteínas foi realizada usando o software Mascot 2.2 e o banco de dados de proteínas de *A. brasiliense* sp245 (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011).

4.18. Identificação e quantificação de proteínas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS

As amostras provenientes da eluição nos itens 4.14 e 4.15 foram liofilizadas, e enviadas ao Dr. Gustavo A. de Souza - Instituto de Imunologia – Oslo, Noruega, com o qual foi firmada uma parceria. Para a análise, 15 μ g de amostra foram ressuspensas em 50 μ L de bicarbonato de amônio 100 mM pH 8,0. As amostras foram reduzidas com 1 μ L de DTT 1 mM por 45 min e, em seguida, alquiladas com 1 μ L iodacetamida 5,5 mM por 30 minutos no escuro. As amostras foram então tripsinizadas durante a noite, à temperatura ambiente (Tripsina Promega modificada;

proporção 1:50 (m/m)). A concentração de TFA foi ajustada para 3% (v/v) (concentração final), e as amostras foram concentradas utilizando STAGE-TIP (Thermo Scientific) conforme especificações do fabricante. Os 15 µg de amostra foram utilizados para correr uma triplicata técnica (volume total pós STAGE-TIP, 18 µL; volume de injeção por replicata: 5 µL). O gradiente usado foi 12-35% de solvente B em 120 minutos (solvente B: 90% acetonitrila, 0.095% ácido fórmico em água), fluxo de 300 nL/min. A separação foi feita por uma coluna analítica de 15 cm, 75 µm diâmetro interno, resina de fase reversa com diâmetro de 3 µm. O sistema de LC usado foi um Dionex Ultimate 3000nano, com coluna Dionex com conexão Viper. A amostra foi injetada em um Orbitrap da linha QExactive (quadrupolo/Orbitrap, Thermo). A aquisição foi feita de acordo com os seguintes parâmetros:

MS Scan: Microscans: 1
 Resolution: 70,000
 AGC target: 1e6
 Maximum Injection Time: 20 ms
 Scan range: 300-1750 m/z

MS/MS data dependent acquisition
 Microscans: 1
 Resolution: 35,000
 AGC target: 1e6
 Maximum injection time: 120 ms
 Loop Count: 10
 MSX: 1
 Isolation width: 2.0 m/z
 Fixed first mass: 100 m/z
 Collision energy: 25.0

Dd settings: Underfill ratio: 0.1%
 Charge exclusion: unassigned; 1
 Dynamic exclusion: 45 s

Os dados foram então processados pelo software MaxQuant (COX; MANN, 2008). A quantificação foi realizada de acordo com duas propriedades de cada peptídeo: a) o perfil de eluição cromatográfico; e b) a intensidade do pico no MS Scan. Para estatística foi realizada análise ANOVA, utilizando o programa Perseus.

(LUBER *et al.*, 2010; COX *et al.*, 2011; GEIGER *et al.*, 2012). As proteínas foram identificadas por comparação com o banco de dados de *A. brasilense* sp245.

4.19. Purificação da proteína BCCP de *A. brasilense*

4.19.1. Expressão das proteínas His-BCCP e BCCP nativa de *A. brasilense*

A expressão das proteínas AbBCCP-His e AbBCCP nativa foi realizada em células *E. coli* BL21 (λ DE3) contendo os plasmídeos indicados na tabela 2. Quatrocentos mililitros de meio LB foram inoculados na proporção de 1:100 com uma cultura crescida durante a noite. As células foram crescidas sob agitação até DO₆₀₀ 0,5-0,7 e então foram adicionados 0,5 mM de IPTG à cultura, que foi mantida por mais 3 horas a 37°C sob agitação. A cultura foi mantida em gelo por 15 minutos e centrifugada a 2.240 x g por 5 minutos a 4°C. As células foram congeladas a -20°C até o uso ou imediatamente ressuspensas em tampão de sonicação.

4.19.2. Purificação de AbBCCP-His

As células obtidas conforme descrito no item 4.19.1 foram ressuspensas em 20 mL de tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 100 mM NaCl e 5% glicerol (v/v)). A suspensão celular foi sonicada no sonicador Heat System em 15 ciclos de 15 segundos com 15 segundos de intervalo em banho de gelo e o extrato celular foi então centrifugado por 20 minutos a 20000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi aplicado em coluna HiTrap Chelating pré carregada com NiCl₂ e equilibrada com tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM). A eluição foi realizada com gradiente de imidazol (50, 100, 200, 300 e 500 mM de imidazol, Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM). As frações obtidas foram aplicadas em gel SDS PAGE, conforme descrito no item 4.13. As frações contendo maior quantidade de proteínas

com maior grau de pureza foram reunidas e dialisadas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM e 20% de glicerol. As amostras foram quantificadas, aliquotadas e armazenadas a -20°C.

4.19.3. Purificação de AbBCCP nativa

Para a purificação de AbBCCP nativa, foram inicialmente realizados testes de coluna cromatográfica, a fim de se determinar por qual resina BCCP nativa teria afinidade. O *pellet* celular obtido a partir de 200 mL de cultura (conforme descrito no item 4.19.1) foi ressuspenso em 10 mL tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 7,5) e sonificado em 15 ciclos de 15 segundos seguidos 15 segundos de intervalo, em banho de gelo e centrifugado por 20 minutos a 20000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi dividido em 5 frações, e testado quanto à ligação nas resinas Q FF, SP, DEAE, Heparina e CM (GE Healthcare). Para o teste, 1,5 mL de resina foi adicionada a um tubo plástico de 14 mL e lavada com H₂O ultrapura sucessivas vezes e então equilibradas com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. O extrato contendo BCCP foi incubado com as diferentes resinas por 15 minutos, sob agitação casual. Após a incubação, o sobrenadante foi coletado e as resinas foram lavadas com 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, para remoção das proteínas não-adsorvidas à resina. Em seguida, foi realizada uma lavagem com 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e NaCl 100 mM, para remoção das proteínas fracamente adsorvidas à resina e a eluição foi realizada com 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e NaCl 1 M, para eluição das proteínas adsorvidas mais fortemente. As frações obtidas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5%, conforme descrito no item 4.14.

Para a purificação final de BCCP, foi utilizada a coluna Q FF de 1 mL (GE Healthcare), acoplada a bomba peristáltica. O sobrenadante da centrifugação (após sonicação) foi injetado na coluna pré-equilibrada com tampão A. A coluna foi lavada com 5 mL de tampão A, e a eluição foi realizada com gradiente crescente de NaCl nas concentrações de 50, 100, 250, 350, 500, 700 e 1000 mM de NaCl em Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Foram coletadas frações de 1 mL. Aliquotas de 10 µL das frações obtidas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5%. As frações que continham maior quantidade de BCCP foram reunidas e aplicadas na coluna de gel filtração

Sephacryl S200 com tampão com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM e glicerol 5% (v/v). As frações que continham BCCP foram agrupadas, concentradas, aliquotadas e armazenadas a -20°C.

4.20. Expressão das proteínas EcBC-His, EcCT-His, EcBCCP, EcBirA, HsGlnD e PII

A expressão das proteínas EcBC-His, EcCT-His, EcBCCP, EcBirA, EcGlnB, EcGlnK, AbGlnB, AbGlnZ e HsGlnD (GlnD de *Herbaspirillum seropedicae*) foi realizada conforme descrito no item 4.18.1. A expressão das proteínas PII de *S. elongatus* (nativa e variantes) foi realizada em *E. coli* RB9060, conforme descrito por Heinrich *et al.*, (2004).

4.21. Purificação das proteínas BirA-His, BC-His e CT-His de *E. coli* e GlnD-His de *Herbaspirillum seropedicae* (HsGlnD His)

As proteínas HsGlnD, EcBirA, EcBC e EcCT contendo cauda de histidina foram purificadas conforme descrito no item 4.19.2.

4.22. Purificação da proteína BCCP de *E. coli*

A purificação de EcBCCP foi realizada conforme descrito por Rodrigues e colaboradores (2014), utilizando a coluna cromatográfica DEAE sepharose.

4.23. Purificação das proteínas PII de *A. brasilense* e *E. coli*

A purificação das proteínas AbGlnB, AbGlnZ e EcGlnK foi realizada conforme descrito por Moure e colaboradores (2012), porém sem a etapa de aquecimento e com o acréscimo de uma etapa de gel filtração (Sephacryl S-200 HR HiPrep 26/60, 320 mL, GE Healthcare), com tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0, KCl 100 mM e glicerol 5% (v/v). A proteína EcGlnB foi purificada em coluna HiTrap DEAE sepharose, com gradiente de KCl. As frações obtidas contendo maior quantidade de proteínas foram reunidas e injetadas na coluna Sephacryl S-200 com tampão com tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0, KCl 100 mM e glicerol 5% (v/v). As frações contendo PII foram concentradas por centrifugação (Amicon Ultra-15 Millipore – 10K). As amostras foram quantificadas, aliquotadas e armazenadas a -20°C.

4.24. Purificação das proteínas GlnB (nativa e mutantes) de *S. elongatus*

A purificação das proteínas SeGlnB, SeGlnB_Y51A, SeGlnB_S49E, SeGlnB_E54A, SeGlnB_R45A, SeGlnB_R47A, SeGlnB_S49D, SeGlnB_S49G, SeGlnB_T52A, SeGlnB_E85A, SeGlnB_I86N e SeGlnB_R103H foi realizada de acordo com Heinrich e colaboradores (2004), utilizando a coluna strep-tag (IBA Lifesciences), seguindo as recomendações do fabricante.

4.25. Uridililação das proteínas PII

A uridililação das proteínas PII foi realizada de acordo com BONATTO *et al* (2007) O tampão de uridililação continha a seguinte composição: 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM KCl; 25 mM MgCl₂; PII; UTP 2 mM; ATP 200 µM; 2-OG 5mM e HsGlnD His 1 µM. A reação foi incubada por 3 horas a 37°C. A uridililação foi checada por gel nativo (ARAÚJO, 2003). Após a confirmação da uridililação, a proteína GlnD foi removida com a utilização de coluna HiTrap Chelating. A fração

não ligada à coluna contendo PII uridililada foi extensivamente dialisada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM e glicerol 20% (v/v), para garantir a remoção de ATP e 2-OG.

4.26. Ensaio de atividade de ACCase *in vitro*

A atividade de ACC foi medida por ensaio enzimático acoplando a atividade de hidrólise de ATP de ACC com a atividade das enzimas piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH), como descrito (BEEZ *et al.*, 2009; BROUSSARD *et al.*, 2013b), com algumas modificações. O tampão utilizado consistiu em imidazol 50 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 20 mM, NADH 0,2 mM, fosfoenolpiruvato 1 mM, ATP 10 mM, DTT 0,5 mM, LDH 4,4 unidades, PK 6 unidades e $NaHCO_3$ 10 mM. As reações continham 10 nM de CT (concentração de tetrâmero), 20 nM de BC (concentração de dímero) e 200 nM BCCP (concentração de monômero). O pH final da reação foi de 7,5 e o volume final, de 400 μ L. Diferentes concentrações de PII e 2-OG foram usadas conforme indicado nas figuras. As reações foram pré-incubadas durante 15 minutos a 25°C e iniciadas com a adição de acetil-CoA a 400 μ M (exceto quando indicado de outra forma). A oxidação de NADH a NAD^+ foi registrada a 25°C por 10-20 min em espectrofotômetro (SPECORD 200 photometer - Analytik Jena) no comprimento de onda de 340 nm. A partir do coeficiente angular (*slope*) de diminuição da absorção, a velocidade de reação foi calculada com o coeficiente de extinção de NADH de 6220 M^{-1} . Para a determinação das constantes catalíticas, os dados foram ajustados à equação de Michaelis-Menten usando Software GraphPad Prism. O K_{cat} de ACC foi calculado utilizando o número dos tetrâmeros CT nas reações. O teste de Kolmogorov-Smirnov demonstrou distribuição normal dos dados obtidos com os ensaios acoplados, podendo ser aplicada estatística paramétrica. Os dados foram analisados usando teste *t* paramétrico não-pareado (GraphPad Prism 6.0). Probabilidades <0,05 foram aceitas como significativas.

5. RESULTADOS

5.1. Ensaio de interação *in vitro* de His-GlnZ com extrato de *A. brasilense* 2812

As proteínas PII de *A. brasilense*, GlnZ e GlnB, estão diretamente envolvidas com o controle da fixação de nitrogênio. Parte de suas funções se dá por interação proteína-proteína com as proteínas DraG e DraT, respectivamente, e ainda com as proteínas NifA e AmtB (CHEN *et al.*, 2003; HUERGO *et al.*, 2006a, 2009, 2012; GERHARDT *et al.*, 2012). Entretanto, existem indícios de que proteínas PII possam desenvolver ainda outras funções no metabolismo celular. A fim de investigar possíveis proteínas ligantes de PII, foram realizados ensaios de interação com a proteína His-GlnZ e extrato de *A. brasilense* 2812 (Ab2812). Ab2812 é um duplo mutante para PII, ou seja, seu genoma não contém os genes codificantes para GlnZ e GlnB. Ab2812 foi a estirpe selecionada para este trabalho, para garantir que todos os possíveis alvos de PII estivessem dissociados de PII intracelular, potencializando a interação dessas proteínas com PII *in vitro*. Devido à importância dos efetores ADP, ATP e 2-OG na função e estrutura de proteínas PII, foram utilizadas condições diferenciais para interação e eluição. Foram realizados três ensaios de interação de GlnZ com extrato de *A. brasilense* (tabela 5), que serão descritos a seguir.

Tabela 5 – Ensaio de interação entre AbGlnZ e extrato de Ab2812

Ensaio	Interação ^a	Eluição ^a	Resina
EI1 ₁	ATP	ATP + 2-OG	HiTrap <i>Chelating</i>
EI2 ₁	ADP	ATP + 2-OG	HiTrap <i>Chelating</i>
EI2 ₂	ADP	ATP + 2-OG	HiTrap <i>Chelating</i>
EI3 ₁	ATP	ATP + 2-OG	HiTrap <i>Chelating</i>
EI3 ₂	ATP	ATP + 2-OG	Protino Ni-IDA 1000
EI3 ₃	ATP	ATP + 2-OG	ANTI-FLAG M2 Magnetic Beads

Fonte: a autora.

^a Os tampões utilizados continham Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, imidazol 20 mM, 5 mM de MgCl₂ e ATP 1mM ou ADP 1 mM ou ATP 1 mM + 2-OG 1,5 mM

5.1.1. Ensaio 1 (EI1) - Ensaio de interação de His-GlnZ e extrato de Ab2812 na presença de ATP e eluição com ATP e 2-OG

O ensaio de interação baseia-se em combinações de efetores para interação/eluição devido à capacidade de PII de ligar ADP, ATP e 2-OG e alterar sua conformação de acordo com o efector ligado e, em consequência, alterar sua interação com proteínas alvo. A primeira condição testada nos ensaios de interação entre His-GlnZ e *A. brasilense* 2812 foi a interação na presença de ATP e eluição na presença de ATP e 2-OG.

O ensaio EI1 foi realizado como descrito no item 4.14, utilizando 2 colunas cromatográficas HiTrap Chelating em paralelo (Coluna 1 – GlnZ; coluna 2 – Controle Ct), conforme mostrado na figura 13. As frações de lavagem (L1 e L2, Ct e GlnZ), eluição específica com ATP e 2-OG (E1-5, Ct e GlnZ) e eluição com 500 mM de imidazol (Im1-2, Ct e GlnZ) foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10 e 12% (Fig. 15 A-B). Para análise das amostras, foram comparadas as frações eluídas especificamente (E1 e E2) entre as condições controle e GlnZ. Visualmente, foram identificadas no gel de eletroforese 17 proteínas diferenciais (presentes na condição GlnZ, mas não na condição controle), as quais foram analisadas por espectrometria de massa e 6 identificadas positivamente como mostrado na tabela 6. Entre as proteínas identificadas, destaca-se a proteína Acetil-CoA carboxilase – subunidade proteína carreadora de carboxil biotina (BCCP) por, primeiro, estar presente em todas as repetições do experimento e, segundo, já ter sido descrita por interagir com PII na planta *Arabidopsis thaliana* (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010).

Para confirmar a presença de BCCP nas frações obtidas e verificar se de fato ela ocorria apenas na presença de GlnZ, foi realizado um ensaio de *western blot* revelado com estreptavidina-HRP (Sigma) (Fig. 15C), que é específico para proteínas biotiniladas, e o resultado confirmou a presença desta proteína apenas na condição GlnZ. Por isso, essa proteína foi utilizada como controle positivo para os demais ensaios de interação e para a análise das frações. Além de BCCP, foram visualizadas mais 4 proteínas biotiniladas nas frações de eluição específica (E1_{GlnZ} e E2_{GlnZ}), sendo que essas proteínas ainda não foram identificadas. Porém, de acordo com massa molecular e análises de bioinformática do genoma de *A. brasilense* sp245 para identificar proteínas biotiniladas, é possível que essas bandas sejam as

subunidades biotiniladas das proteínas propionil-CoA Carboxilase (73KDa), Metilmalonil carboxiltransferase (55,6 KDa) e Metilcrotonil-CoA carboxilase (72 KDa), todas presentes no genoma de *A. brasilense* e com domínio biotinil.

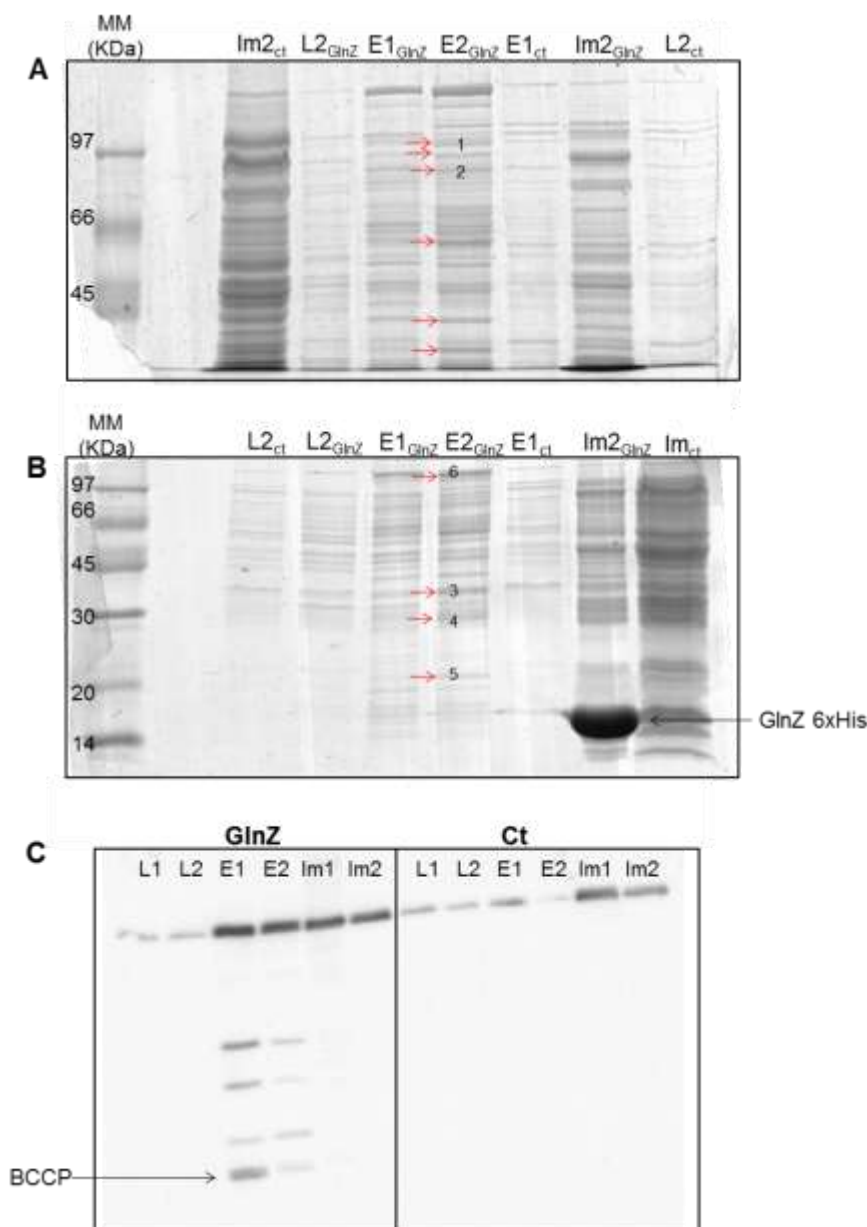


Figura 15 - Ensaio de interação de His-GlnZ com extrato de *A. brasilense* 2812. Extrato contendo a proteína His-GlnZ foi aplicado em coluna de afinidade por níquel. A coluna foi lavada com tampão de interação contendo ATP 1 mM e em seguida foi adicionado extrato de *A. brasilense* 2812. Foram feitas lavagens (L) e eluições específica (E) com ATP e 2-OG 1mM e inespecífica (im) com imidazol 500 mM. No grupo controle (Ct), o extrato de *A. brasilense* foi aplicado diretamente à coluna, sem His-GlnZ. As frações obtidas em cada etapa foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10% **(A)** ou 12,5% **(B)** e coradas com Comassie Blue ou reveladas com estreptavidina-HRP (Sigma) por *western blot* **(C)**. Ct – coluna controle; GlnZ– coluna carregada com His-GlnZ; E– eluição específica; L – fração de lavagem; Im – eluição com 500 mM de Imidazol. MM – marcador de massa molecular (KDa). Setas vermelhas indicam as proteínas diferenciais entre Ct e GlnZ e os números sobre as bandas em **(A)** e **(B)** correspondem aos números observados na tabela 6. Fonte: a autora.

Tabela 6 - Proteínas diferenciais identificadas no ensaio de interação de His-GlnZ e extrato de *A. brasilense* 2812 analisadas por MALDI-TOF.

	Proteína	MM ^c (KDa)	MM calculada ^d (KDa - Gel)	Escore [*]
1	AzoBR 200103 proteína conservada de função desconhecida	101	102 ^a	42
2	Enzima málica dependente de NADP	82	90 ^a	76
3	Provável polissacarídeo deacetilase/ provável Alcanesulfonato ABC transportador	34/35	50 ^b	44/44
4	Orotato fosforibosiltransferase	25	39 ^b	55
5	Acetil-CoA carboxilase - BCCP	15	21 ^b	54
6	Subunidade β RNA polimerase	152	96 ^b	58

Fonte: a autora.

^{*}Índice gerado pelo programa MASCOT, sendo que quanto maior o escore, maior a chance de se ter uma identificação positiva.

^a gel SDS-PAGE 10%

^b gel SDS-PAGE 12,5%

^c Massa Molecular

^d a “massa Molecular calculada” foi calculada a partir do gel por equação da reta, usando os padrões de migração dos marcadores de massa molecular

As frações E1 e E2 das condições GlnZ e controle foram ainda liofilizadas, e enviadas ao Dr. Gustavo A. de Souza, Instituto de Imunologia – Oslo, Noruega. As amostras foram analisadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação (*label free*) LC/MS/MS em espectrômetro QExactive em triplicata e analisadas no software MaxQuant¹. Foram identificadas cerca de 2000 proteínas, sendo que dessas, mais de 600 proteínas foram diferenciais entre as condições GlnZ e controle ($p < 0,05$). Entretanto, a fim de se obter uma lista de proteínas mais prováveis de serem alvos de AbGlnZ, foi estipulado empiricamente que a quantidade da proteína na fração E2_{GlnZ} deveria ser no mínimo 15 vezes maior do que na fração controle (E2_{Ct}), com $p < 0,05$. Dessa forma, foram selecionadas 73 proteínas no ensaio E11. As proteínas consideradas possíveis candidatas estão apresentadas na tabela 7 (E11).

¹ Essa etapa foi desenvolvida pelo Dr. Gustavo A. de Souza - Instituto de Imunologia – Oslo, Noruega.

Tabela 7 – Compilação das proteínas identificadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS e MALDI-TOF

Código		Proteína	Espectrometria de massa quantitativa sem marcação						MALDI-TOF ^d	
			TI ^b – ATP TE ^c – ATP 2-OG				TI ^b – ADP TE ^c – ATP 2-OG		TI ^b – ATP TE ^c – ATP 2-OG	
			EI1	EI3 ₁	EI3 ₂	EI3 ₃	EI2 ₁	EI2 ₂	EI1	EI3
392381643	<u>G8AJG7</u>	Orotate phosphoribosyltransferase	3439	301	34				x	x
392378424	<u>G8ANL6</u>	Conserved protein of unknown function; putative coiled-coil and glutathione domains	1141	394	495	3				x
392381448	<u>G8AIW8</u>	Putative glutamine-dependent NAD(+) synthetase (nade-like)	780	204		3				
392382441	<u>G8ALX8</u>	Gamma-Glu-putrescine synthase	377	284	153	5				
392378414	<u>G8ATR8</u>	Putative Diguanylate cyclase/phosphodiesterase with PAS/PAC domain	328	479	231	5				
392378858	<u>G8APW6</u>	Uncharacterized protein (DNA-directed RNA polymerase subunit omega)	250	23	37	34				
392381353	<u>G8AIM1</u>	Leucine aminopeptidase	218	104	375	2				
392378157	<u>G8ASZ7</u>	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) reductase (ACP-reductase - fabg)	170	273	29	7				
392383132	<u>G8AEY8</u>	Acetyl-coa carboxylase, biotin carboxyl carrier subunit	165	104	1160	20			x	
392377996	<u>G8ASI0</u>	Glutamine-dependent NAD(+) synthetase (NAD(+)) synthase	142	83	9	20				
392379898	<u>G8AZB2</u>	Phosphoenolpyruvate-protein fosfotransferase (EI PTS ^{sugar})	127	18	2	3				
392383677	<u>G8ATT3</u>	Acetyl/propionyl-coa carboxylase, alpha chain	109	13	161	2				
392378320	<u>G8ATG9</u>	Ribonuclease G	106	595	817	15				
392380013	<u>G8AZN1</u>	Thiamine biosynthesis protein thig/ Thiazole synthase	77	94	3	13				

Continua

Tabela 7 – Compilação das proteínas identificadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS e MALDI-TOF

Código		Proteína	Espectrometria de massa quantitativa sem marcação						MALDI-TOF ^d	
			TI ^b – ATP TE ^c – ATP 2-OG				TI ^b – ADP TE ^c – ATP 2-OG		TI ^b – ATP TE ^c – ATP 2-OG	
			EI1	EI3 ₁	EI3 ₂	EI3 ₃	EI2 ₁	EI2 ₂	EI1	EI3
392378882	G8APZ0	Conserved protein of unknown function; putative Transglutaminase domain	61	213	35	13				
392380987	G8AGG4	Ribonuclease PH	58	21	7	3	4	18		x
392380750	G8AFB3	NADP-dependent malic enzyme	55	3	12	6			x	
392380883	G8AG60	Transcription termination factor Rho	42	283	224	1	2	9		x
392383679	G8ATT5	Acetyl/propionyl-coa carboxylase, beta chain	35	18	264					
392378176	Q59085	RNA polymerase sigma-54 factor	32	3	3	3				
392378192	G8AT38	Chaperone protein clpb/ ATP-dependent chaperone	31	5	3	4				
392377568	G8AR84	Ribonuclease R	25	913	1390	14				
392381055	G8AH50	Large subunit of chaperonin groesl	25	3	6	5				
392378152	G8ASZ2	Acyl-coa reductase	25	234	12	9				
392380734	G8AF97	Phosphopantothienoylcysteine decarboxylase (coac) Phosphopantothenatecysteine ligase (coab)	17	4	4	6				
392382597	G8AME0	Putative diguanylate cyclase, GGDEF domain	16	185	7	17	17	21		
392379901	G8AZB5	PTS system permease (iiaman), nitrogen regulatory IIA protein	16	16	4	25				
392384513	G8AWA1	Short-chain dehydrogenase/reductase (3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase		941	373	6	46	29		
392378859	G8APW7	ppGpp synthetase		191	82	4	13	11		
392377171	G8AQ29	Trk system potassium uptake protein trka		47	28		11	4		
392384530	G8AWC0	Putative signal transduction histidine kinase		25	7	7	4	6		
392382107	G8AKW1	Putative hydrolase of the metallo-beta-lactamase superfamily		14	25	3	3	5		

Tabela 7 – Compilação das proteínas identificadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS e MALDI-TOF

Código		Proteína	Espectrometria de massa quantitativa sem marcação						MALDI-TOF ^d	
			TI ^b – ATP			TI ^b – ADP			TI ^b – ATP	
			TE ^c – ATP 2-OG			TE ^c – ATP 2-OG			TE ^c – ATP 2-OG	
Gi	Uniprot ^a		EI1	EI3 ₁	EI3 ₂	EI3 ₃	EI2 ₁	EI2 ₂	EI1	EI3
392380138	G8B008	Putative Transcriptional regulator, gntr family		869	484	3				
392381887		Conserved protein of unknown function		8	273	20				
392382643	G8AMI8	Transcription repair coupling factor		3	228	26				
392382381	G8ALQ8	Putative xanthine and CO dehydrogenases maturation factor, xdhc/coxi family protein		49	201	15				
392378188		Conserved protein of unknown function		252	199	3				
392382981		50S ribosomal protein L31		5	143	35				
392381088	G8AH86	Putative cold-shock protein		4	54	22				
392378881	G8APY9	Conserved protein of unknown function		4	50	4				
392377168	G8AQ26	Transcriptional regulator involved in nitrogen fixation		3	50	3				
392379809	G8AZ21	Cold-shock DNA-binding domain protein		42	50	14				
392383023		50S ribosomal subunit protein L10		3	38	6				
392383807	G8AU75	Metallo-beta-lactamase		89	26	5				
392380815		Conserved protein of unknown function		29	22	23				
392377287		Transcriptional regulator, lysr family		9	20	5				
392380780	G8AFE3	30S ribosomal protein S20		14	19	13				
392382025		30S ribosomal subunit protein S11		11	18	11				
392384393		Large subunit of chaperonin groesl		5	11	3				
392381726	G8AJQ0	Putative cold shock protein		3	9	11				
392382500	G8AM39	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase		5	9	3				
392382976		Conserved protein of unknown function		24	9	3				

Tabela 7 – Compilação das proteínas identificadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS e MALDI-TOF

Código		Proteína	Espectrometria de massa quantitativa sem marcação						MALDI-TOF ^d	
			TI ^b – ATP			TI ^b – ADP			TI ^b – ATP	
			TE ^c – ATP 2-OG			TE ^c – ATP 2-OG			TE ^c – ATP 2-OG	
Gi	Uniprot ^a		EI1	EI3 ₁	EI3 ₂	EI3 ₃	EI2 ₁	EI2 ₂	EI1	EI3
392382698	G8AMP3	Putative transcriptional regulator, Ros/mucr family		4	7	7				
392383012	G8AEL6	30S ribosomal subunit protein S10		3	7	390				
392382998		30S ribosomal protein S14		5	6	38				
392377391	G8AQQ3	Excinuclease ABC, subunit A excinuclease ABC, subunit A		4	6	9				
392381485	G8AJ05	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthetase		3	5	17				
392378303		Conserved protein of unknown function		18	4	3				
392381667	G8AJJ1	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit		7	4	11				
392377420	G8AQT3	Putative chromosome segregation and condensation protein scpb		23	4	5				
392380832	G8AG09	Putative transcriptional regulator, Ros/mucr family		5	4	9				
392378182	G8AT26	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase		7	4	9				
392380178	G8B048	Conserved protein of unknown function		3	3	3				
392382145	G8AL01	SOS response transcriptional repressor, lexa		7	3	3				
392381242	G8AI67	Putative GTP-binding protein		6	3	5				
392378880	G8APY8	Conserved protein of unknown function; putative Transglutaminase domain		3	157					
392377504	G8AR18	DNA processing single strand binding protein		230	77					
392381511	G8AJ33	Pseudouridine synthase		97	57					
392380713	G8AF76	Putative ATP-dependent DNA/RNA helicase		120	43					
	Q0MS31	Cpn60	34				11	8		

Tabela 7 – Compilação das proteínas identificadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS e MALDI-TOF

Código		Proteína	Espectrometria de massa quantitativa sem marcação						MALDI-TOF ^d	
			TI ^b – ATP TE ^c – ATP 2-OG				TI ^b – ADP TE ^c – ATP 2-OG		TI ^b – ATP TE ^c – ATP 2-OG	
			EI1	EI3 ₁	EI3 ₂	EI3 ₃	EI2 ₁	EI2 ₂	EI1	EI3
392380891	G8AG68	Putative pyruvate, phosphate dikinase regulatory protein	983							
392378423	G8ATS7	Uncharacterized protein	552							
	<u>Q05755</u> ;	Glutamate synthase [NADPH] large chain;	486							x
	<u>Q59084</u>	Glutamate synthase (NADPH)								
392378058	G8ASP2	Putative Phosphoglycerate dehydrogenase (PGDH),sera-like	234							
392384522	G8AWB0	Putative methyl-accepting chemotaxis sensory transducer	175							
392382074	B5ANZ5	Dehydratase maoc (maoc desidratase/Putative dehydratase with a maoc-like domain)	158							
392382587	<u>G8AMD0</u>	Putative uncharacterized protein	137							
392380827	G8AG04	Putative phosphate starvation-inducible protein,phoh-like	136							
392377175	<u>G8AQ33</u>	Gtpase hflx 1	118							
392383211	G8AFP1	DNA repair protein recn	116							
392379879	<u>G8AZ93</u>	C4-dicarboxylate transport transcriptional regulatory protein (Response regulator in two-component regulatory system	93							
392382987	G8ANK0	Putative glutamate--cysteine ligase	91							
392383133	G8AEY9	3-dehydroquinate desidratase	89							
392382031	G8AKN5	Replication-associated recombination protein A	80							
392382345	G8ALL3	Replicative DNA helicase	72							
392382338	G8ALK6	DNA repair protein radA	72							

Tabela 7 – Compilação das proteínas identificadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS e MALDI-TOF

Código		Proteína	Espectrometria de massa quantitativa sem marcação						MALDI-TOF ^d	
			TI ^b – ATP TE ^c – ATP 2-OG				TI ^b – ADP TE ^c – ATP 2-OG		TI ^b – ATP TE ^c – ATP 2-OG	
			EI1	EI3 ₁	EI3 ₂	EI3 ₃	EI2 ₁	EI2 ₂	EI1	EI3
392382460	<u>G8ALZ7</u>	Molybdenum cofactor biosynthesis protein E	71							
392381656	G8AJI0	Vitamin B12-dependent ribonucleotide reductase	69							
392383651	G8AIE4	Putative methyl-accepting chemotaxis receptor	66							
392378132	G8ASX0	GMP reductase	65							
392383020	<u>G8AEM4</u>	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	63							
392380814	G8AFH7	Transcription termination/antitermination protein nusa	57							
392380792	G8AFF5	Putative GCN5-related N-acetyltransferase	55							
392382862	G8AN67	Sensor protein	53							
392381717	<u>G8AJP1</u>	Glycosyltransferase protein	46							
392382026	<u>G8AKN0</u>	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	46							
392382655	<u>G8AMK0</u>	Cobyric acid synthase	39							
392383596	G8AHS3	Uncharacterized protein	39							
392381721	G8AJP5	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming)	38							
392378874	G8APY2	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	35							
392382352	<u>G8ALM0</u>	Malonyl coa-acyl carrier protein transacylase, fabd	33							
392382889	<u>G8AN98</u>	RNA polymerase sigma factor rpoD	32							
392382706	<u>G8AMQ1</u>	Bifunctional: GTP cyclohydrolase II/3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase	32							
	Q6QW94	GDP-mannose 4,6-dehydratase	31							
392377428	G8AQU0	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolase-like protein	30							

Tabela 7 – Compilação das proteínas identificadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS e MALDI-TOF

Código		Proteína	Espectrometria de massa quantitativa sem marcação						Conclusão MALDI-TOF ^d	
			TI ^b – ATP TE ^c – ATP 2-OG				TI ^b – ADP TE ^c – ATP 2-OG		TI ^b – ATP TE ^c – ATP 2-OG	
Gi	Uniprot ^a		EI1	EI3 ₁	EI3 ₂	EI3 ₃	EI2 ₁	EI2 ₂	EI1	EI3
392381389	G8AIQ7	Bifunctional protein hldE	29							
	<u>Q05756</u>	Glutamate synthase [NADPH] small chain	29							
392381239	G8AI64	Acetylglutamate kinase	28							
	B5ANZ9	Putative uncharacterized protein	27							
	Q6QW26	Putative CDP tyvulose epimerase	24							
392382840	G8AN45	RNA polymerase sigma factor rpoh	23							
392381201	G8AI18	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase	23							
392383019	G8AEM3	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	19							
392382957	G8ANG8	Flagellar motor switch protein flim	17							
	G8AIR8	Probable transaldolase	16							
392382476	G8AM13	Putative uncharacterized protein (cell division protein zapa)					84	25		
392381149	G8AHW4	Pyrimidine (Deoxy)nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase					54	183		
392381198	G8AI15	Putative uncharacterized protein					14	228		
392378507	G8ANV5	Adenine deaminase					8	2		
392382577	G8AMC0	4-alpha-glucanotransferase (malq-like)					7	6		
392377534	G8AR48	Putative uncharacterized protein					7	9		
	<u>A7Y9V0</u>	Glutamine synthetase adenyltransferase (Fragment)					5	4		x
392377737	G8ARR1	Diaminopimelate decarboxylase					4	3		
392380948	G8AGC5	Spermidine synthase					4	13		
392380087	G8AZV7	Multidrug efflux transporter					3	5		

Fonte: a autora.^a Proteínas com código Uniprot sublinhado estão descritas no texto^b Tampão de Interação^c Tampão de Eluição^d Proteínas identificadas por MALDI-TOF estão assinaladas com X

Os números apresentados nas colunas de “Espectrometria de massa quantitativa sem marcação” correspondem ao enriquecimento da proteína na fração E_{GlnZ} em relação à fração E_{Ct}, com exceção das amostras de EI2₁ e EI2₂, que correspondem ao enriquecimento de E_{GlnZ} em relação à L1_{GlnZ};

As proteínas identificadas estão ordenadas da seguinte forma: ordem decrescente de enriquecimento de EI1 (para as amostras que foram identificadas em mais de uma condição); ordem decrescente de enriquecimento de EI3 (EI3₁, EI3₂ e EI3₃); ordem decrescente de enriquecimento de EI1 (proteínas que foram identificadas apenas nesse ensaio); ordem decrescente de enriquecimento de EI2 (EI2₁ e EI2₂);

EI2₁ e EI2₂ – duplicatas da condição ADP/ATP+2-OG

EI3₁ – HiTrap *Chelating*

EI3₂ – Protino Ni-IDA 1000

EI3₃ – ANTI-FLAG M2 Magnetic Beads

5.1.2. Ensaio 2 (EI2) - Ensaio de interação na presença de ADP e eluição com ATP e 2-OG

Foram realizados ensaios de interação His-GlnZ + Ab2812 nas condições: (interação/eluição) ADP/ATP+2-OG (Fig. 16); ADP/ATP; ATP/ADP; ATP+2-OG/ADP; ATP+2-OG/ATP (descrita acima). Os ensaios foram realizados em duplicata. Entretanto, para as condições que não continham 2-OG no tampão de eluição, uma quantidade muito pequena de proteínas foi detectada, sendo necessária a utilização do método de coloração por nitrato de prata para que bandas fossem visualizadas (dados não mostrados). Para essas frações, a dosagem do conteúdo proteico indicou concentrações que variaram de 0 a 36 µg/mL, com exceção da condição ADP/ATP+2-OG, que apresentou 32 µg/mL na fração L1_{GlnZ1} e 249 µg/mL na fração E2_{GlnZ1} do ensaio 1 e 26 µg/mL na fração L1_{GlnZ2} e 378 µg/mL na fração E2_{GlnZ2} do ensaio 2.

Para a análise por espectrometria quantitativa sem marcação por LC/MS/MS são necessários 15 µg de proteínas por replicata, as condições ADP/ATP, ATP/ADP e ATP+2-OG/ADP não apresentaram quantidade suficiente para a análise, com comparações, uma vez que as frações controle e as frações de lavagem da condição GlnZ apresentaram quantidade de proteína inferior a 17 µg/mL. Desse modo, apenas as amostras obtidas no ensaio ADP/ATP+2-OG foram utilizadas para análises posteriores (Fig. 16).

As amostras provenientes da duplicata do ensaio ADP/ATP+2-OG foram analisadas inicialmente por gel SDS-PAGE (Fig. 16A) e bandas diferenciais foram identificadas e extraídas do gel para análise por espectrometria de massa. Entretanto, nenhuma das proteínas analisadas obteve identificação positiva. As frações foram ainda analisadas por *western blot* para identificação de proteínas biotiniladas. Foram observadas três bandas biotiniladas, mas nenhuma delas foi confirmada como BCCP (Fig. 16B).

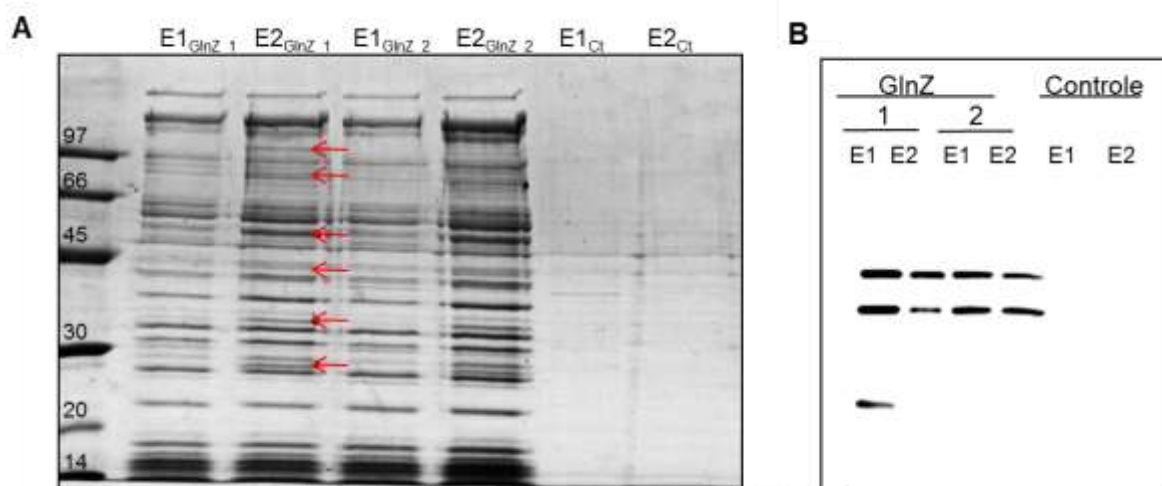


Figura 16 - Ensaio de interação de His-GlnZ com extrato de *A. brasilense* 2812. Extrato contendo a proteína His-Glnz foi aplicado na coluna HiTraP *Chelating*. A coluna foi lavada com tampão de interação contendo ADP 1 mM e em seguida foi adicionado extrato de *A. brasilense*. Foram feitas lavagens e eluição específica (E) com ATP e 2-OG 1 mM e inespecífica com imidazol 500 mM. No grupo controle (Ct), o extrato de *A. brasilense* foi aplicado diretamente à coluna, sem His-Glnz. As duas primeiras frações eluídas especificamente E1 e E2 foram aplicadas em gel 12,5% e coradas com Comassie Blue coradas **(A)** ou reveladas com estreptavidina-HRP (Sigma) por *western blot* **(B)**. O ensaio foi realizado em duplicata, sendo GlnZ 1 equivalente ao ensaio 1 e GlnZ 2, ao ensaio 2. As setas indicam as proteínas diferenciais no gel que foram analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF, porém sem identificação positiva. Fonte: a autora.

Setenta microgramas de proteínas das frações E2_{GlnZ1} e E2_{GlnZ2}, 23 µg da fração L2_{GlnZ1} e 19 µg da fração L2_{GlnZ2} foram liofilizados e enviados ao Dr. Gustavo para análise. Os dados obtidos são apresentados na tabela 7 (EI2 – Espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS).

Foram identificadas 545 proteínas na análise por LC/MS/MS, sendo que, dessas, 16 foram selecionadas como possíveis alvos de GlnZ, considerando os parâmetros de $p < 0,05$, enriquecimento de pelo menos 2 vezes na fração GlnZ em relação ao controle e presença nos dois ensaios ADP/ATP+2-OG (EI2₁ e EI2₂).

A obtenção de amostras suficientes para análise apenas nas condições onde 2-OG estava presente no tampão de eluição pode estar relacionada ao fato de, no metabolismo de *A. brasilense*, a concentração de 2-OG exercer grande influência sobre PII e ser determinante para a ocupação de PII por ADP ou ATP (GERHARDT *et al.*, 2012). Entretanto, é necessário se considerar a hipótese de 2-OG estar interferindo na ligação das proteínas à resina, podendo estar atuando como um quelante de níquel. Essa hipótese foi considerada devido à eluição parcial de GlnZ em algumas frações eluídas especificamente com ATP e 2-OG (dados não mostrados). O mesmo efeito de eluição parcial foi observado para os ensaios com GlnB his, porém com eluição de uma quantidade maior de GlnB do que de GlnZ, e devido a isso, não foi dado prosseguimento aos ensaios com GlnB.

5.1.3. Ensaio 3 (EI3) - Ensaio de interação na presença de ATP e eluição com ATP e 2-OG utilizando diferentes resinas

A fim de se determinar se parte das proteínas obtidas nos ensaios EI1 e EI2 poderiam ser falsos positivos decorrentes de um efeito de 2-OG sobre o níquel ligado à resina, optou-se pela utilização de duas outras opções de resina.

Neste ensaio foram utilizadas duas colunas para His-GlnZ e uma resina para GlnZ-FLAG. Foram utilizadas as resinas HiTrap Chelating de 1 mL, Protino Ni-IDA 1000 (Macherey-Nagel) 1 mL e beads magnéticos contendo anticorpo monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma).

A escolha de uma segunda coluna de afinidade a proteínas com 6xHis-tag ocorreu devido à quantidade de proteínas presentes nas frações de lavagem mesmo após 20 mL de lavagem (L2_{GlnZ} – fig. 15A) e também à eluição de His-PII (GlnZ e GlnB) por 2-OG (dados não mostrados). Desse modo, a coluna Protino Ni-IDA foi selecionada para comparação. O grupo funcional ligado à resina é o mesmo encontrado na HiTrap Chelating: ácido iminodiacético (IDA) (fig. 17). Entretanto, a Protino é descrita como sendo capaz de obter maior pureza da proteína alvo, com menos interações inespecíficas, devido a uma otimização da matriz, com baixa densidade de ligantes IDA na superfície.

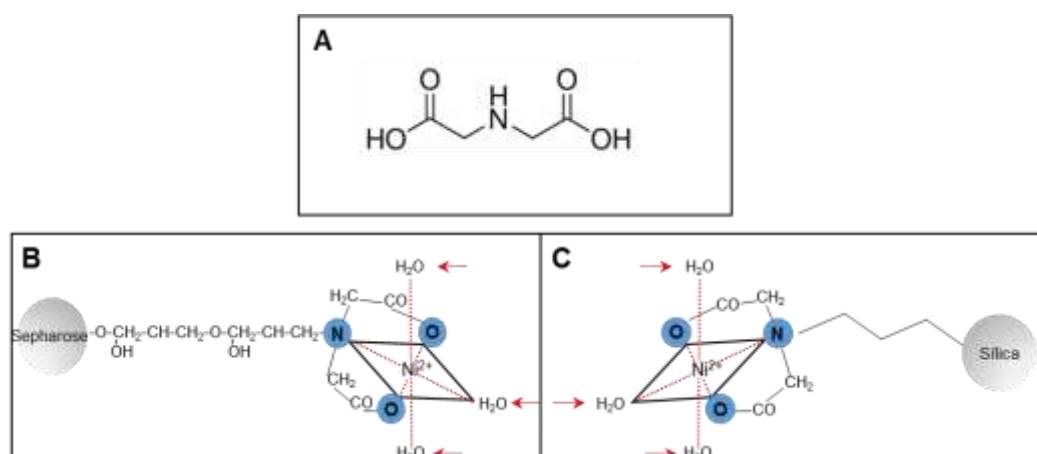


Figura 17 - Comparação das resinas das colunas HiTrap Chelating HP e Protino Ni-IDA. A – Ácido Iminodiacético (IDA). B – Matriz da coluna HiTrap Chelating (GE Healthcare): grupo IDA ligado à sepharose de alta performance (Sepharose High Performance). C – Matriz da coluna Protino Ni-IDA 1000 (Macherey/Nagel): IDA ligado à sílica. Fonte: a autora.

Os tampões utilizados foram Tris-HCl pH 8,0, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, imidazol 25 mM (Tampão de lavagem – TL), TpL + 1 mM de ATP no tampão de interação (TI) e TL + 1 mM de ATP e 1,5 mM de 2-OG no tampão de eluição (TE).

Para as duas primeiras resinas, foram utilizados extrato de *A. brasilense* 2812 (Ab2812) e extrato de *E. coli* contendo His-GlnZ (ambos diluídos em TL). O extrato de Ab2812 foi primeiramente passado na coluna controle a fim de remover proteínas que interagissem com a coluna e depois passado numa segunda coluna pré-carregada com His-GlnZ e equilibrada com TI. Em seguida o ensaio prosseguiu conforme descrito para EI1 (Fig. 13)

Para a resina anti-FLAG, foram usadas duas condições (controle e GlnZ) conforme descrito no item 4.15. Todas as lavagens foram coletadas gerando as frações L 1-6 (GlnZ ou Ct). A eluição específica foi realizada com duas lavagens de TE (frações E1-2, GlnZ ou Ct) e para a remoção de GlnZ-FLAG, foi adicionado 500 µL de TS contendo 0,2 µg/µL de peptídeo (P) 3X FLAG (frações P_{Ct} ou P_{GlnZ}) (Fig. 14).

As frações obtidas nas três condições foram analisadas por eletroforese e as bandas diferenciais e mais abundantes em relação aos controles foram extraídas do gel e analisadas por espectrometria de massa (Fig. 18; Tabela 8). As frações obtidas utilizando a resina Protino Ni-IDA apresentaram menor quantidade de proteínas nas

frações controle e nas lavagens, o que indica menos ligações inespecíficas à resina e pode resultar em uma menor quantidade de falsos positivos identificados.

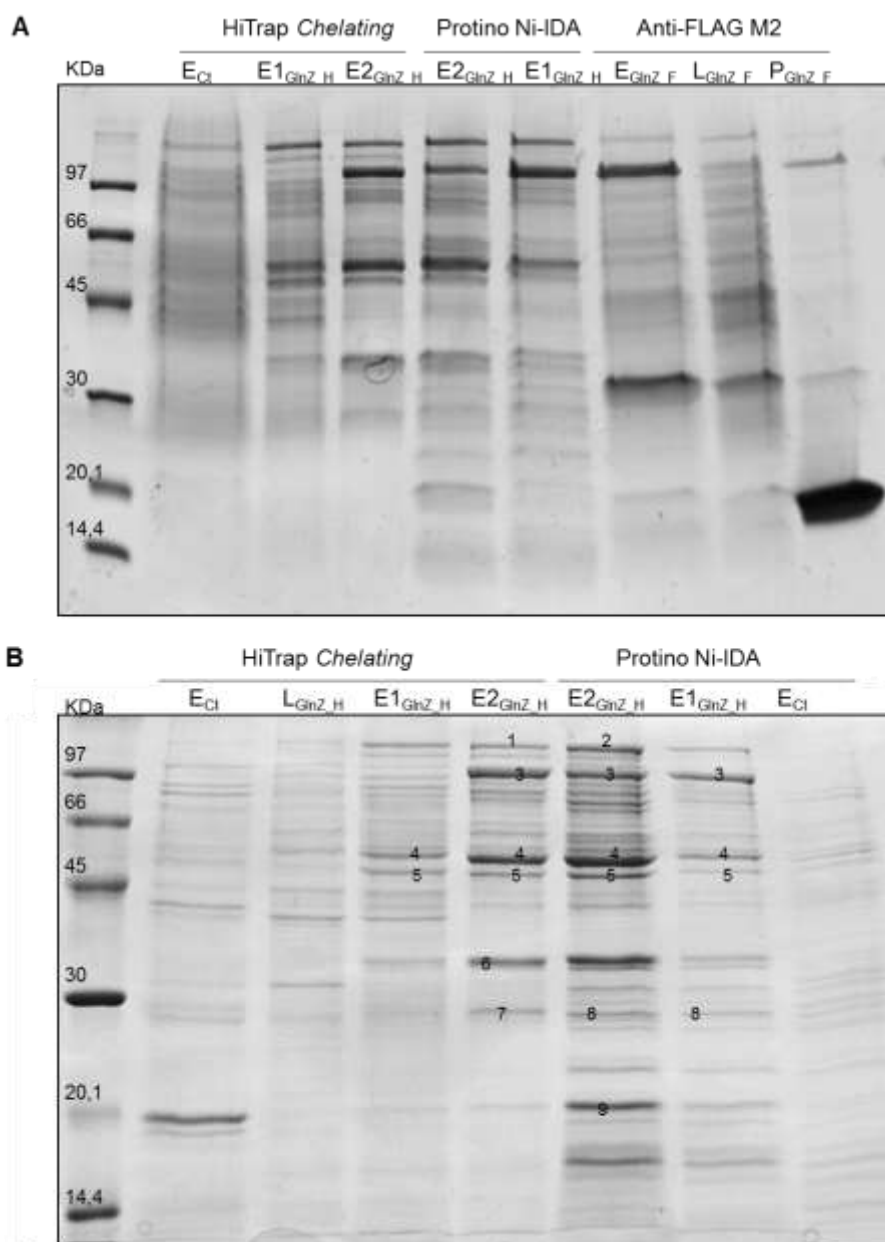


Figura 18 - Ensaio de interação de GlnZ com extrato de *A. brasilense* 2812 utilizando diferentes colunas cromatográficas. Os ensaios foram realizados com 1 mM de ATP no tampão de interação e com 1 mM de ATP e 1,5 mM de 2-OG no tampão de eluição. Cinco µg das frações obtidas na coluna HiTrap Chelating, Protino Ni-IDA ou com beads magnéticos anti-FLAG M2 foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% (A) ou 10% (B) e coradas com Comassie Blue. Ct – coluna controle; GlnZ_H – coluna carregada com His-GlnZ; GlnZ_F – coluna carregada com GlnZ-FLAG; E – eluição específica; L – fração de lavagem; P – eluição com peptídeo 3xFLAG. Os números sobre as bandas correspondem às proteínas identificadas na tabela 8. Fonte: a autora.

Análises por MALDI-TOF levaram à identificação de 9 proteínas presentes na condição GlnZ e não no controle, algumas comuns às resinas HiTrap Chelating, Protino Ni-IDA e Anti-FLAG (Fig. 18) e algumas exclusivas a apenas uma resina (Fig. 18). A identidade das proteínas marcadas na figura 18B como 3 (ATase), 4 (proteína conservada de função desconhecida), 6 (proteína conservada de função desconhecida) e 7 (orotato fosforibosiltransferase) foram confirmadas por MALDI-TOF MS/MS (Tabela 8).

Tabela 8 - Proteínas diferenciais identificadas por MALDI-TOF no ensaio EI3

	Proteína	Escore*	MM ^a (KDa)	MM calculada ^b (KDa gel)	Peptídeos identificados	MS/MS ^c
1	Glutamato sintase sub. α	57	113	90	9	
2	RNA polimerase sub. β	175	152	90	30	-
3	Glutamato-amônia ligase adenilil transferase (ATase)	69	111	80	9	+
4	Proteína conservada de função desconhecida	215	54	55	23	+
5	Fator Rho de terminação de transcrição	147	47	52	17	+
6	Proteína conservada de função desconhecida	61	37	35	8	+
7	Orotato fosforibosiltransferase	87	25	29	7	+
8	50S ribossomal sub. L1	73	25	27	7	-
9	50S ribossomal	52	18	18	6	-

Fonte: a autora.

*Índice gerado pelo programa MASCOT, sendo que quanto maior o escore, maior a chance de se ter uma identificação positiva.

^a Massa Molecular

^b a "massa Molecular calculada" foi calculada a partir do gel por equação da reta, usando os padrões de migração dos marcadores de massa molecular

^c "+" indica identificação positiva MS/MS e "-" indica proteínas que não foram identificadas

As frações E2 GlnZ e Ct foram ainda analisadas por LC/MS/MS sem marcação (tabela 7 – EI3₁, EI3₂ e EI3₃). As frações E2_{GlnZ} provenientes das resinas HiTrap *Chelating* (EI3₁) e da resina Protino Ni-IDA (EI3₂) foram comparadas com a fração E2_{Ct} da resina HiTrap *Chelating*. Já a fração E2_{GlnZ} da resina magnética Anti-FLAG M2 (EI3₃) foi comparada com a fração E2_{Ct} da mesma resina. Considerando como parâmetro $p < 0,05$, foram identificadas 375 proteínas para EI3₁, 974 para EI3₂

e 598 pra EI3₃. Para EI3₂, mesmo com parâmetros mais restritivos ($p < 0,01$), foram identificadas 414 proteínas diferenciais entre as frações E2_{GlnZ} e E2_{Ct}.

A fim de reduzir a quantidade de proteínas candidatas (e de falsos positivos), foram consideradas como possíveis alvos de GlnZ as proteínas que apresentaram-se enriquecidas pelo menos duas vezes na fração E2_{GlnZ} ($E2_{GlnZ}/E2_{Ct}$) e que estivessem presente em pelo menos duas das condições analisadas em EI3. Desse modo, foram selecionadas 69 proteínas em EI3₁, 68 em EI3₂ e 62 em EI3₃ (Tabela 7).

5.2. Análise das proteínas identificadas como possíveis alvos de GlnZ

Foram identificadas 125 proteínas como sendo prováveis alvo de GlnZ, com $p < 0,05$ e razão $E2_{GlnZ}/E2_{Ct}$ maior que 2 (no ensaio EI2 a razão utilizada foi entre $E2_{GlnZ}/L2_{GlnZ}$). Dessas 125 proteínas, 45 foram exclusivas do ensaio EI1 (ATP/ATP+2-OG), 11 do ensaio EI2 (ADP/ATP+2-OG) e 37 exclusivas do ensaio EI3 (ATP/ATP+2-OG; EI3₁, EI3₂ e EI3₃). Vinte e quatro proteínas foram comuns aos ensaios com ATP/ATP+2OG (EI1 e EI3), 1 proteína foi identificada em EI1 e EI2, 4 em EI2 e EI3 e 3 proteínas foram comuns a todos os ensaios (EI1, EI2 e EI3) (fig. 19A).

Quanto à distribuição, foram identificadas proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídeos, aminoácidos, cofatores e vitaminas e nucleotídeos, além de proteínas relacionadas ao processamento de informação genética e ambiental e proteínas não classificadas (Fig. 19B). As proteínas classificadas como envolvidas no processamento de informação ambiental apresentaram diversidade de funções (Fig. 19C), como participação na biogênese do ribossomo, chaperonas, fatores de transcrição, metabolismo nitrogênio, mobilidade celular, processamento da informação genética, processamento e reparo do DNA, resistência a drogas, transdução do sinal e transporte de membrana.

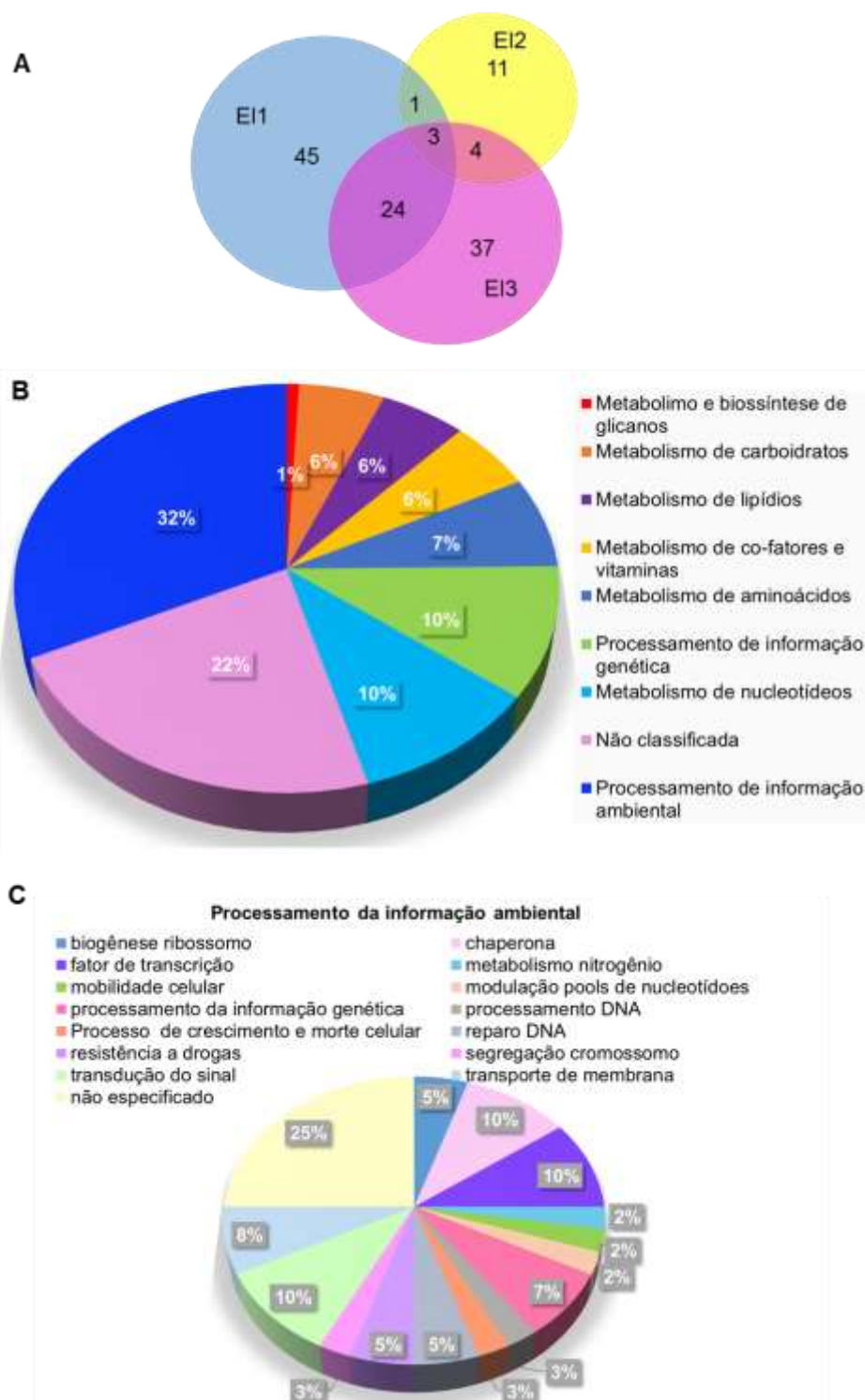


Figura 19 – Distribuição das proteínas identificadas por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS. (A) Proteínas obtidas na tabela 7 foram distribuídas de acordo com ensaio no qual foram identificadas. Círculo azul corresponde às proteínas identificadas em EI1, Amarelo – EI2 (EI2₁ + EI2₂), Rosa – EI3 (EI3₁ + EI3₂ + EI3₃). Sobreposição azul e amarelo: proteínas comuns aos ensaios EI1 e 2, sobreposição círculos azul e rosa: proteínas comuns aos ensaios EI1 e 3, sobreposição círculos rosa e amarelo: proteínas comuns aos ensaios EI2 e 3, sobreposição dos três círculos: proteínas comuns aos 3 ensaios. **(B)** distribuição das proteínas identificadas de acordo com a via metabólica da qual participam. **(C)** Distribuição das proteínas identificadas na categoria processamento da informação ambiental. **(B)** e **(C)** foram desenvolvidos com base na anotação no site KEGG das proteínas identificadas. Fonte: a autora.

Dentre as proteínas identificadas, destaca-se a G8AEY8 (BCCP). Essa proteína foi identificada em todos os ensaios realizados na condição de interação com ATP e eluição ATP+2-OG. BCCP (proteína carreadora de carboxi biotina) é uma subunidade da enzima Acetil-CoA carboxilase (ACC, EC 6.4.1.2), que catalisa a etapa limitante na síntese ácidos graxos, com a conversão de acetil-CoA a malonil-CoA (Fig. 20). A interação PII-BCCP já foi descrita em *A. thaliana* (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010), o que sugere que BCCP possa ser um alvo de PII também em *A. brasilense*.

Além de BCCP, as proteínas G8ATT3 e G8ATT5 foram identificadas nas condições de interação com ATP e eluição ATP+2-OG. G8ATT3 e G8ATT5 estão anotadas como acetil/propionil-CoA carboxilase, cadeia alfa (α) e beta (β), respectivamente, embora uma análise por *Blast* tenha identificado ambas as proteínas como provável 3-metilcrotonil-CoA carboxilase. G8ATT3 possui domínio biotinoil e massa de 72 KDa; é provável que esta proteína seja uma das demais proteínas biotiniladas observadas na figura 13C.

G8ATT5 corresponde à subunidade β da acetil/propionil-CoA carboxilase e possui domínio crotonase. A enzima propionil-CoA carboxilase (PCC) é, assim como ACC, uma acil-CoA carboxilase. PCC catalisa a conversão de propionil-CoA a metilmalonil-CoA e, em alguns organismos, está envolvida com a síntese de ácidos graxos e de policetídeos (DIACOVICH *et al.*, 2004). Em *Streptomyces coelicolor*, ACC e PCC compartilham a mesma subunidade α (ACCA2), diferindo apenas quanto à subunidade β , a qual confere especificidade ao substrato (acetil-CoA ou propionil-CoA) (DIACOVICH *et al.*, 2004). Muito pouco se sabe do que difere entre ACC e PCC, as enzimas PCC geralmente apresentam atividade de ACC, porém, apresentam maior afinidade para propionil-CoA do que para acetil-CoA. Em Archea, PCC está relacionada à assimilação autotrófica de carbono (HÜGLER *et al.*, 2003; HOU; XIANG; HAN, 2015).

Devido à semelhança entre ACC e PCC, é possível que proteínas PII exerçam efeito sobre ambas as enzimas, sugerindo que PII possa ter um efeito geral sobre proteínas biotiniladas. Feria Bourrelier e colaboradores (2010) também verificaram a presença de mais proteínas biotiniladas co-eluídas com PII no ensaio em que a interação PII-BCCP foi identificada em *A. thaliana*.

Além de BCCP e das subunidades α e β de acetil/propionil-CoA carboxilase, mais quatro proteínas do metabolismo de ácidos graxos foram identificadas como prováveis alvos de GlnZ. G8ASZ2 e G8ASZ7 foram identificadas nos ensaios EI1 e EI3, G8ALM0 no ensaio EI1 e G8AWA1 nos ensaios EI2 e EI3. G8ASZ7 e G8AWA1 estão anotadas como 3-oxoacil- (proteína carreadora de acil) -redutase (ACP redutase) e desidrogenase/redutase de cadeia curta, respectivamente. Uma análise de G8ASZ7 e G8AWA1 por *Blast* indicou que ambas apresentam ~97% de homologia com a enzima 3-oxoacil-ACP redutase de *E. coli*, codificada pelo gene *fabG*. FabG catalisa a redução de intermediários 3-oxoacil-[ACP] a intermediários 3-hidroacil-[ACP], de forma dependente de NADPH, participando da via de biossíntese de ácidos graxos em procariotos, estando relacionada ao metabolismo de ácidos graxos (elongação de ácidos graxos – Fig. 20 – e biossíntese de ácidos graxos insaturados) e metabolismo de biotina.

G8ASZ2 está anotada como provável acil-CoA redutase e não possui homólogo em *E. coli*, estando anotada no KEGG como “sem função conhecida”. G8ASZ2 está anotada como EC 1.2.1.50, catalisando a oxidação de aldeídos de cadeia longa a acil-CoA de cadeia longa, de forma dependente de NADP⁺.

A última proteína do metabolismo de ácidos graxos identificada foi G8ALM0, anotada como malonil-CoA-ACP transacilase (*fabD*). Malonil-CoA-ACP transacilase catalisa a segunda etapa da via de síntese de ácidos graxos (a primeira é catalisada por ACC) que consiste na conversão de malonil-CoA a malonil-ACP (malonil-proteína carreadora de acil) (Fig. 20).

A identificação de diferentes proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos sugere que proteínas PII possam ter uma função sobre o controle dessa via.

G8AFB3, anotada como enzima málica NADP-dependente (*maeB* – EC 1.1.1.40) foi identificada nos ensaios EI1 e EI3 (ATP/ATP+2-OG) por espectrometria quantitativa sem marcação e em EI1 por espectrometria MALDI-TOF. MaeB atua no metabolismo de carbono e catalisa a reação Piruvato + HCO_3^- + NADPH \rightleftharpoons Malato + NADP, sendo que, em bactérias, MaeB e enzima málica NAD-dependente (MaeA) fazem parte do nó fosfoenolpiruvato (PEP)-piruvato-oxaloacetato (OAA), ligando as vias glicolítica, gluconeogênica e ciclo dos ácidos tricarboxílicos (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007).

Em *E. coli*, a descarboxilação oxidativa do malato, catalisada por MaeB, é inibida por acetil-CoA, OAA e fumarato e ativada pelos aminoácidos aspartato e glutamato, açúcar fosfato (glucose-6P) e acetil fosfato (acetil-P) (BOLOGNA; ANDREO; DRINCOVICH, 2007). Estudos para aumentar a produção de ácidos graxos por *E. coli* verificaram que o aumento da expressão de MaeB, juntamente com a disponibilidade de malato no meio (que serve como substrato para MaeB, gerando mais NADPH e, como consequência da reação, mais piruvato que pode ser convertido a acetil-CoA), levaram a um aumento no acúmulo de ácidos graxos (5,6 vezes) (MENG *et al.*, 2010). Os autores destacam, ainda, que esse aumento poderia ser maior, caso não houvesse inibição de ACC por acil-ACPs (produto final da reação).

Em *S. coelicolor* também foi observada uma relação entre a atividade da enzima málica (NAD⁺ e NADP dependentes) e o acúmulo de ácidos graxos (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Mutantes *maeA* e duplo mutante *maeA/maeB* apresentaram menor produção de antibióticos (policetídeos) e o duplo mutante apresentou menor acúmulo de triacilglicerol (TGA), indicando que a deficiência da enzima málica (MaeA ou ambas) acarreta interrompimento do fluxo de carbono do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), diminuindo formação de acetil-CoA e, consequentemente, a formação de policetídeos e ácidos graxos. O interrompimento na formação de policetídeos de ácidos graxos podem ser também uma consequência da redução nos níveis de NADPH, que é a principal molécula utilizada como poder redutor requerido para as reações de síntese.

G8AF97 (anotada como fosfopantotenoilcisteína descarboxilase (CoaC)/fosfopantotenatocisteína ligase (CoaB) foi identificada nos ensaios EI1 e EI3 e é uma enzima envolvida na biossíntese de coenzima A (CoA). É possível que o efeito

de PII sobre o metabolismo de carbono e lipídeos seja muito mais complexo do que a regulação de biossíntese de ácidos graxos, podendo se expandir também para vias de biossíntese de cofatores. Essa hipótese é reforçada pelo fato de mais seis enzimas que participam do metabolismo de cofatores terem sido identificadas nos ensaios de interação realizados (G8AZN1, G8ASI0, G8AIW8, G8ALZ7, G8AMK0 e G8AMQ1). Entre essas enzimas, G8AMQ1 está relacionada a biossíntese de riboflavinas, G8AMK0 (ácido cóbrico sintase, *cobQ*) participa da síntese de cobalamina (GALPERIN; GRISHIN, 2000) e G8AZN1 (proteína de biossíntese de tiamina ThiG) participa da biossíntese de tiamina (LEONARDI *et al.*, 2003).

A proteína MoaE (G8ALZ7) foi identificada como possível alvo de GlnZ na condição EI1. Essa proteína participa da síntese do cofator molibdênio molibdopterina, o qual está presente em diversas enzimas, incluindo enzimas relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, como a nitrato redutase (IOBBI-NIVOL; LEIMKÜHLER, 2013). Uma busca no Pfam identificou domínios de ligação a molibdênio fusionado a domínios de PII em *Leptospirillum ferrooxidans*. O genoma desse organismo codifica 6 diferentes proteínas PII-like e a PII fusionada está localizada em um operon junto com o gene convencional PII-like e com o gene *nasA* que codifica para nitrato redutase. É possível que PII controle a utilização de nitrato indiretamente por regular a síntese do cofator molibdênio. De fato, há evidências de regulação por PII da utilização de nitrato em cianobactérias e cloroplastos de plantas (FERRARIO-MÉRY; MEYER; HODGES, 2008; OHASHI *et al.*, 2011).

Outras duas proteínas foram identificadas como a enzima NAD sintetase (NadE), identificada nos ensaios EI1 e 3 (ATP/ATP+2-OG). Foram identificadas duas isoformas: NAD⁺ sintetase dependente de glutamina (G8ASI0) e provável NAD⁺ sintetase dependente de glutamina (G8AIW8). Três isoformas de NadE aparecem anotadas no genoma de *A. brasilense* Sp245 (Biocyc.org), sendo duas dependentes de glutamina (com domínio glutaminase e sintetase) e uma dependente de amônio (apenas um domínio sintetase) como doador de nitrogênio (DE INGENIIS *et al.*, 2012; HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013). Em análise de vizinhança gênica (String), diversos organismos apresentam os genes *nadE* e *glnB* ligadas geneticamente, com destaque para as β -proteobactérias (entre elas *Herbaspirillum seropedicae* e *Azoarcus* sp.). A associação de GlnB e NadE (glutamina-dependente) no contexto genômico sugere que proteínas PII possam ter efeito sob a atividade de

enzimas NadE glutamina-dependentes, regulando sua atividade em resposta à concentração de glutamina intracelular (ARCONDÉGUY; JACK; MERRICK, 2001; HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013).

Conforme esperado, várias proteínas envolvidas no metabolismo de nitrogênio foram identificadas. A proteína glutamina sintetase adenililtransferase (A7Y9V0) (ATase EC 2.7.7.42) foi identificada no EI2 e por MALDI TOF no EI3. ATase (produto do gene *glnE*) é uma enzima bifuncional que catalisa a reação de adenilação (AT) e desadenilação (AR) da enzima glutamina sintetase (GS), regulando assim sua atividade.

Em *E. coli*, ATase pode ligar PII ou PII uridililada (PII-UMP), sendo que cada forma de PII liga-se a uma região diferente de ATase e exerce uma função diferente (JIANG; NINFA, 2007, 2009). PII ligada a ADP se liga à região AR da enzima, inativando-a e ativando a função de adenilação. Já PII-UMP liga-se a região AT, ativando a função removedora de Adenilil (AR) (JIANG; NINFA, 2009).

Em *Rhodospirillum rubrum*, entretanto, apenas PII não modificada exerce efeito ativador sobre ATase (JONSSON; TEIXEIRA; NORDLUND, 2007). Embora essa interação já seja bem estabelecida para diversos organismos, em *A. brasilense* acredita-se que ATase seja apenas regulada por glutamina, uma vez que GlnB e GlnZ não alteram de forma eficiente a adenilação de GS *in vivo* (HUERGO; CHANDRA; MERRICK, 2013). A interação GlnZ-ATase foi detectada nos ensaios contendo ADP, o que está de acordo com os dados obtidos para *E. coli* por Jiang e Ninf (2007). A interação GlnZ-ATase foi também encontrada por análise de gel nos ensaios realizados com ATP (EI3 – MALDI-TOF). Ensaios de validação se fazem necessários para determinar se essa interação é real em *A. brasilense* e em qual condição (efetores) ela ocorre.

Uma maior compreensão sobre a regulação da ATase e, por consequência da atividade de GS, é de especial importância em *A. brasilense*. Mutantes espontâneos de *A. brasilense* FP2 com alteração na regulação e atividade de GS foram capazes de fixar mais nitrogênio que a estirpe selvagem e de excretar amônio proveniente do nitrogênio fixado (MACHADO *et al.*, 1991). Mais recentemente, foi observado que o mutante HM053 apresenta a capacidade de fixar nitrogênio constitutivamente e excretar amônia e fornecer 16 vezes mais nitrogênio que a estirpe selvagem de *A. brasilense* para a planta associada, suprimindo assim as necessidades diárias de

nitrogênio de *Setaria viridis*, refletindo em um maior crescimento das plantas inoculadas (PANKIEVICZ *et al.*, 2015). Esses dados reforçam a importância da enzima GS, bem como a importância de sua regulação e apresentam um organismo que é uma excelente opção para a utilização como biofertilizantes. Um melhor entendimento da regulação de GS em *A. brasilense* pode ajudar a aperfeiçoar ainda mais a utilização dessa bactéria como biofertilizante.

A proteína acetilglutamato quinase (G8A164; *argB*) foi identificada no ensaio EI1. Acetilglutamato quinase, também conhecida como NAGK, participa da via de síntese de arginina, catalisando a segunda etapa da via (Fig. 21), que consiste da conversão de N-acetilglutamato a N-acetilglutamil-P. Na quinta etapa da via, a remoção do grupo acetil da acetilornitina pode ocorrer de duas maneiras distintas: hidroliticamente (como em *E. coli*) ou, mais frequentemente, por transacetilação do glutamato (como em *Pseudomonas aeruginosa* ou *Thermotoga marítima*), com reciclagem do N-acetilglutamato. A forma como essa etapa ocorre determina o papel de retroinibição de arginina na via. No caso de *E. coli*, onde a remoção do acetil é hidrolítica, NAGK é dimérica e arginina tem efeito retroinibitório na primeira enzima da via (NAG sintetase). Já no caso da remoção do acetil por transacetilação, NAGK é hexamérica e sofre retroinibição por arginina (RAMÓN-MAIQUES *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ-MURGA; RUBIO, 2008; LLÁCER; FITA; RUBIO, 2008).

Em cianobactérias, como *S. elongatus*, e cloroplastos de plantas, NAGK é sensível a arginina e é regulada por interação direta com proteínas PII. A ligação de PII ocorre em altas concentrações de ATP e tem efeito ativador sobre NAGK, removendo o efeito de retroinibição por arginina. A presença de 2-OG acarreta a dissociação do complexo, removendo o efeito ativador de PII sobre NAGK (MAHESWARAN; URBANKE; FORCHHAMMER, 2004; LLÁCER; FITA; RUBIO, 2008; BEEZ *et al.*, 2009; CHELLAMUTHU; ALVA; FORCHHAMMER, 2012). Em *A. brasilense*, não há informações quanto ao mecanismo de catálise de NAGK, nem tampouco se trata-se de uma proteína dimérica ou hexamérica. Entretanto, a comparação da sequência de AbNAGK com EcNAGK e SynNAGK (*Synechococcus* sp) por *Blast*, indica que AbNAGK e EcNAGK possuem 32% de identidade e ~50% de similaridade, enquanto AbNAGK e SynNAGK possuem 52% de identidade e ~70% de similaridade, indicando que o mecanismo de AbNAGK pode ser mais parecido com o observado em cianobactérias, com uma maior possibilidade de

efeito de PII sobre essa proteína. O alinhamento das sequências proteicas de AbNAGK, SeNAGK e EcNAGK revelou que AbNAGK possui sete dos dez resíduos envolvidos na formação do complexo NAGK-PII, enquanto EcNAGK compartilha apenas 2 desses resíduos nas mesmas posições. Llácer e colaboradores (2007) postularam que os resíduos E194, R233, R254, Q258 e A257 de NAGK são a assinatura da interação entre NAGK e PII. AbNAGK apresenta 2 desses resíduos conservados (Q266 equivalente a Q258 e R241 equivalente a R233), enquanto EcNAGK não apresenta nenhum.

Em cianobactérias e poucas bactérias heterotróficas, o excesso de arginina é estocado em polímeros de cianoficina, que são polímeros de multi-L-arginil-poli-L-ácido aspártico, que servem tanto para reserva de nitrogênio quanto de energia, uma vez que arginina, ao ser mobilizada do estoque, é convertida a ornitina, gerando um grupo carbamil fosfato que é altamente energético (WANG *et al.*, 2010). Em cianobactérias, a formação de cianoficina ocorre quando PII está associada a NAGK e remove a retroinibição de NAGK por arginina (MAHESWARAN *et al.*, 2006), permitindo, assim, que níveis de arginina sejam suficientemente altos para a atividade de cianoficina sintetase e, desse modo, PII atuaria de modo indireto na regulação da síntese de cianoficinas.

Além da estocagem de arginina em polímeros (que ocorre apenas em alguns organismos), o excesso de arginina está associado à síntese de poliaminas. Poliaminas são pequenos polications orgânicos presentes em todas as células em concentrações de micro a milimolar, sendo importantes para o crescimento e desenvolvimento celular. Triaminas, tais como espermidina, estão associadas a ligação a RNA e influenciam na função ribossômica (LEE *et al.*, 2009). Bactérias sintetizam primariamente duas poliaminas: putrescina e espermidina (Fig. 22). A síntese de putrescina ocorre a partir de ornitina e é catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (*speC*). Em vários organismos, assim como em *E. coli*, o excesso de arginina leva à inibição da sua via de biossíntese e à redução dos níveis de ornitina. Nessa situação, putrescina pode ser sintetizada a partir da descarboxilação de arginina a agmatina, pela enzima arginina descarboxilase (*speA*) (COHEN, 2014). A síntese de espermidina acontece a partir de putrescina e S-adenosil 3-(metiltio)propilamina, reação catalisada pela enzima espermidina sintase (*speE*). É interessante destacar que espermidina sintase (G8AGC5) foi identificada nos

ensaios realizados com ADP/ATP+2-OG. Além dessa proteína, γ -Glu-putrescina sintase (*puuA*) (G8ALX8) foi identificada nos dois ensaios ATP/ATP+2-OG. Em *E. coli*, γ -Glu-putrescina sintase é a primeira enzima da via de utilização de putrescina (fig. 22), sendo essa via de extrema importância, dado que acúmulo de poliaminas pode levar à inibição do crescimento bacteriano (KURIHARA *et al.*, 2008). A presença de NAGK, SpeE e PuuA entre as proteínas identificadas sugere que a proteína GlnZ de *A. brasilense* possa controlar a utilização e/ou síntese de poliaminas.

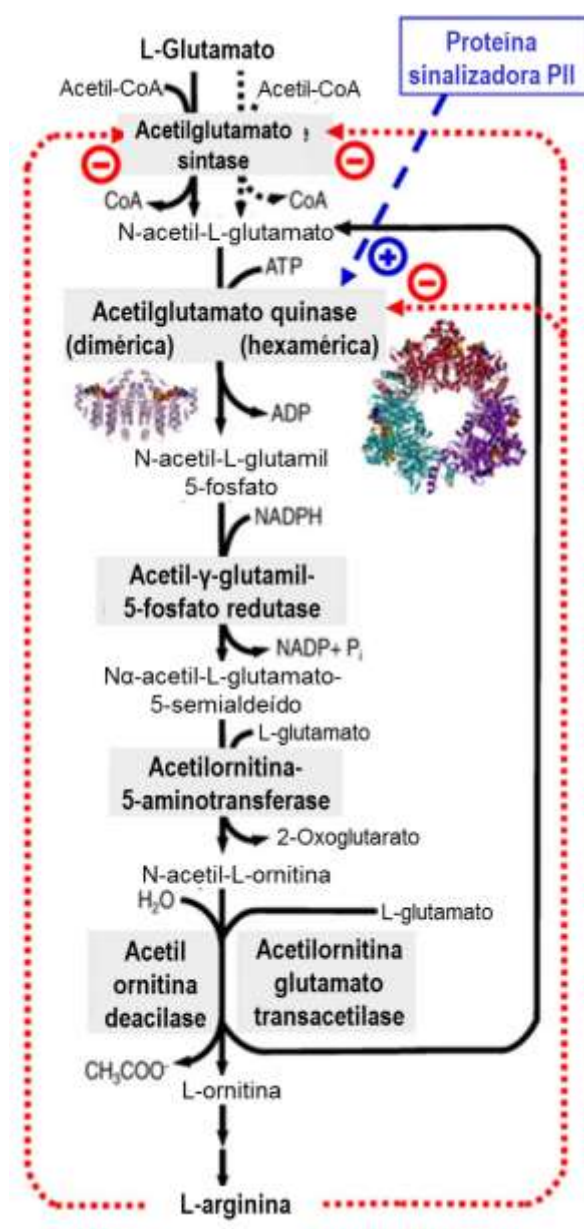


Figura 21 – Esquema da biossíntese de arginina para NAGK dimérica (a esquerda) e hexamérica (a direita). Adaptado de GIL-ORTIZ *et al.*, (2010)

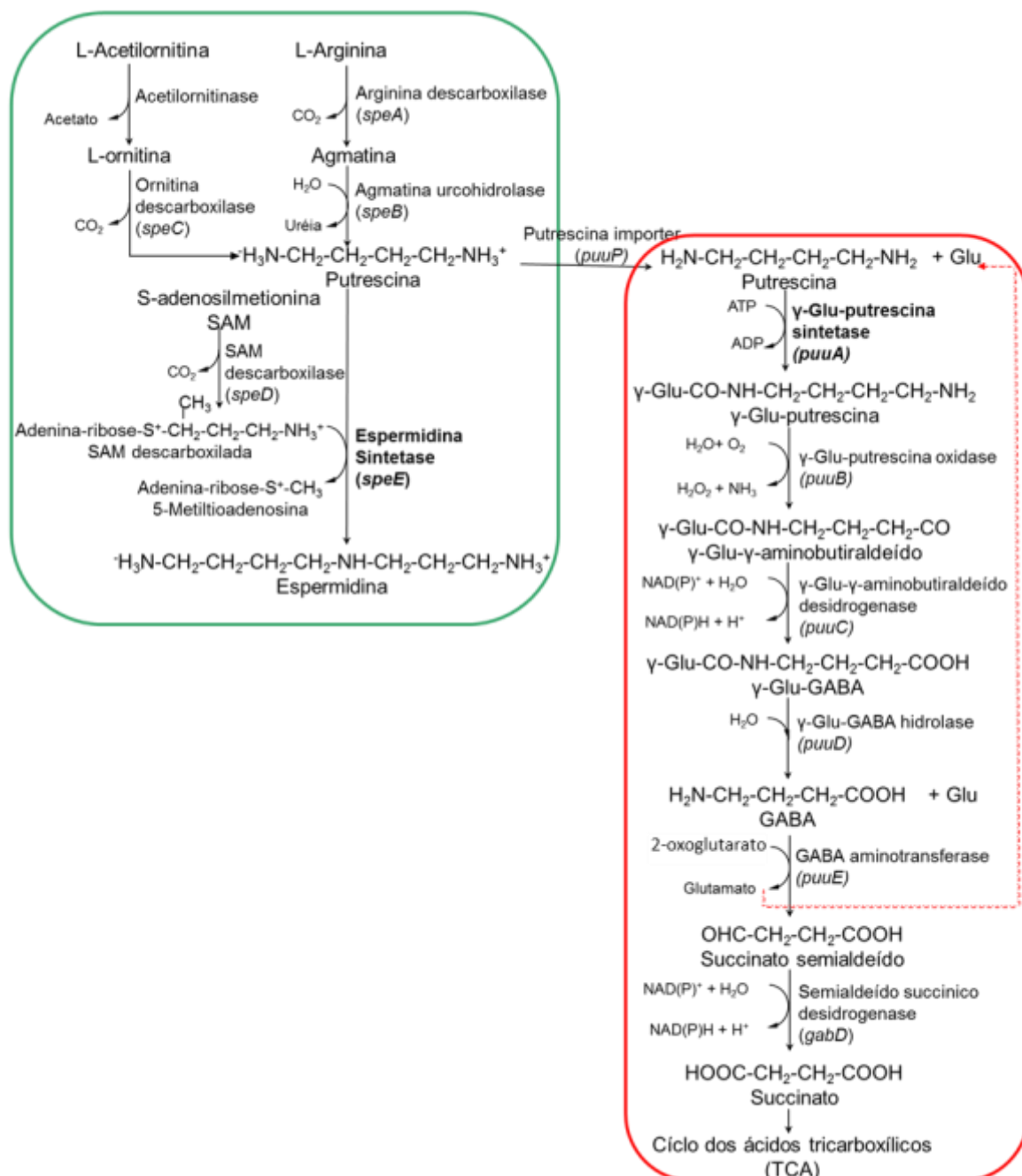


Figura 22 - Via de síntese de poliaminas e degradação de putrescina em *E. coli*. Quadro em verde: biossíntese de poliaminas (adaptado de GLANSDORFF e CHARLIER, 2013). Quadro em vermelho: degradação da putrescina (adaptado de KURIHARA *et al.*, 2008). Proteínas em negrito foram identificadas nos ensaios de interação. Linha vermelha pontilhada indica a reposição de glutamato (Glu).

Q05755, Q59084 e Q05756 correspondem à enzima Glutamato sintase (NADPH) (EC 1.4.1.13) que catalisa a reação: $2 \text{ L-glutamato} + \text{NADP}^+ \rightarrow \text{L-glutamina} + 2\text{-oxoglutarato} + \text{NADPH}$. Glutamato sintase (GOGAT) foi identificada no ensaio EI1 por espectrometria quantitativa sem marcação e em EI3 por

espectrometria por MALDI-TOF. Esta enzima foi purificada e caracterizada em *A. brasilense* sp6 e é uma enzima chave na assimilação de nitrogênio em bactérias fixadoras de nitrogênio (RATTI *et al.*, 1985).

De forma diferente ao que ocorre em *E. coli*, em *A. brasilense* a atividade de GOGAT varia em resposta à concentração de amônio no meio de cultura, sendo que sua atividade é aumentada em células crescendo sob limitação de nitrogênio, enquanto a atividade de glutamato desidrogenase é reprimida. Esses dados indicam que, em *A. brasilense*, a assimilação de amônio via glutamato sintase é a principal rota fisiológica de assimilação de amônio em condições de escassez de nitrogênio (RATTI *et al.*, 1985). GOGAT foi identificada nos ensaios que tinham ATP como condição de interação e ATP + 2-OG como condição de eluição, sugerindo que GlnZ poderia atuar como um regulador da atividade da GOGAT através de interação direta em *A. brasilense*.

G8AZB2, correspondente do componente EI do sistema PTS (Proteína fosfoenolpiruvato fosfotransferase), estava aumentada ($E2_{\text{GlnZ}}/E2_{\text{Ct}}$) em 126x na condição EI1 e 18, 2 e 3x nas condições EI3₁, EI3₂ e EI3₃, respectivamente (Tabela 7). O sistema PTS (fosfotransferase) de açúcares é responsável pela captação e fosforilação de hexoses (e também di- e trissacarídeos), sendo formado por uma proteína que atravessa a membrana plasmática e 4 proteínas solúveis (Fig. 23). EI é a primeira proteína na cascata de transferência de grupos fosfato do fosfoenolpiruvato (PEP) para os açúcares que são transportados pelo componente EIIBC (Fig. 23). EI e HPr são comuns para todos os açúcares transportados, enquanto EIIA é específico para cada tipo de açúcar transportado (por exemplo – glucose EIIA^{Glu}, Manose EIIA^{Man}, frutose EIIA^{Fru}) (DEUTSCHER; FRANCKE; POSTMA, 2006). Trabalhos anteriores mostraram que, em *E. coli*, 2-OG pode coordenar o metabolismo de nitrogênio e carbono via inibição de EI, através de ligação direta de 2-OG a EI^{PTS} (DOUCETTE *et al.*, 2011; VENDITTI; GHIRLANDO; CLORE, 2013).

Além do sistema açúcar:PTS, muitas bactérias possuem um sistema parálogo denominado PTS^{Ntr}. É interessante destacar que a proteína G8AZB5, anotada no Uniprot como sistema permease PTS (IIA^{Man})/proteína regulatória de nitrogênio IIA (EIIA) também foi identificada como possível ligante de GlnZ na presença de ATP. Não foi possível determinar se a proteína identificada é EIIA^{Man} ou EIIA^{Ntr}. Análise de

vizinhança gênica por *Blast* indica que o gene para essa proteína se encontra em um plasmídeo na proximidade dos genes que codificam para EI^{Ntr} e Npr (*ptsI* e *ptsH*) e que esse gene está anotado como *ptsN*. Comparação das estruturas de IIA^{Man} e EIIA^{Ntr} obtidas por estrutura de raio-X indicam que ambas proteínas apresentam alta similaridade na estrutura quaternária, o que sugere que tenham evoluído de um ancestral comum e confirma EIIA^{Ntr} como um membro da família das proteínas manitol-frutose (VAN MONTFORT; DIJKSTRA, 1998). Em *E. coli*, EIIA^{Man} e EIIA^{Ntr} apresentam sítios de fosforilação idênticos, e são fosforiladas por HPr ou NPr, respectivamente. Entretanto, elas diferem quanto ao mecanismo de desfosforilação, IIA^{Man} é desfosforilada por IIB^{Man} durante o transporte de açúcares, com a participação de uma histidina conservada que não está presente em EIIA^{Ntr} (VAN MONTFORT; DIJKSTRA, 1998). Além disso, embora EIIA^{Ntr} possa ser fosforilada por HPr, ela não é capaz de transferir o grupo fosforil para os domínios manose- ou frutose-específicos de IIB^{Man}. O grupo receptor de fosfato de EIIA^{Ntr} ainda não é conhecido e EIIA^{Ntr} apresenta, ainda, capacidade de interagir com outras proteínas de acordo com seu estado de fosforilação/desfosforilação, de forma independente de uma segunda histidina conservada. Essas diferenças podem sugerir um mecanismo para evitar sobreposição do efeito regulatório de EIIA^{Man} e EIIA^{Ntr} (VAN MONTFORT; DIJKSTRA, 1998). EIIA^{Ntr} é a terceira enzima na cascata PTS^{ntr}; é fosforilada por NPr, sendo que EIIA^{Ntr} parece ser o aceptor final de fosforil (Fig. 21) (PFLÜGER-GRAU; GÖRKE, 2010).

Em *E. coli* EIIA^{Ntr} está envolvida com a regulação de diversos processos fisiológicos em resposta a seu estado de fosforilação. O estado de fosforilação de EIIA^{Ntr} é afetado por glutamina (inibida) e 2-OG (ativada), devido aos efeitos de glutamina e 2-OG sobre a autofosforilação do componente EI^{ntr} (LEE *et al.*, 2013). Ainda em *E. coli*, EIIA^{Ntr} parece controlar o fluxo da conversão de piruvato a acetil-CoA, e também do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, por interagir com o complexo piruvato desidrogenase (PDH) (JAHN *et al.*, 2013). Interação entre EIIA^{Ntr} e PDH também foi identificado em *Pseudomonas putida* (PFLÜGER-GRAU; CHAVARRÍA; DE LORENZO, 2011). Além disso, EIIA^{Ntr} está associada ao controle do transporte de potássio e fosfato em *E. coli*, por interagir com o transportador TrKA (LEE *et al.*, 2007) e com os sensores quinase KdpD (LÜTTMANN *et al.*, 2009) e PhoR (LÜTTMANN; GÖPEL; GÖRKE, 2012). Em *Ralstonia eutropha*, EIIA^{Ntr} foi identificada

como capaz de interagir com a proteína SpoT, que faz parte do controle de resposta estrigente (KARSTENS *et al.*, 2014). Além disso, EIIA^{Ntr} de *E. eutropha*, *Azotobacter vinelandii* e *P. putida* parece participar da regulação do acúmulo de polihidroxibutirato (PHB) nesses organismos (SEGURA; ESPÍN, 1998; VELÁZQUEZ *et al.*, 2007; KADDOR; STEINBÜCHEL, 2011).

Dado que o sistema PTS^{Ntr}, assim como GlnZ, pode sensoriar as molécula sinalizadoras de nitrogênio, 2-OG e glutamina, é possível que essa interação seja fisiologicamente relevante e que haja algum tipo de comunicação cruzada entre o sistema PTS e as proteínas PII.

Em diversos organismos, com destaque para proteobactérias (entre elas *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*), o gene *ptsN* (que codifica para EIIA^{Ntr}) aparece em um *operon* que, dentre os genes contidos, apresenta o gene *rpoN* (DEUTSCHER; FRANCKE; POSTMA, 2006; PFLÜGER-GRAU; GÖRKE, 2010). *rpoN* codifica a subunidade fator sigma 54 da enzima RNA polimerase. Sigma 54 direciona a RNA polimerase para promotores de genes envolvidos com metabolismo de nitrogênio e com resposta a estresse. Genes sob o controle de sigma 54 são requeridos em condições específicas de estresse ou quando uma fonte específica de carbono ou nitrogênio está disponível (ZHANG; BUCK, 2015). É interessante que o fator sigma 54 também tenha aparecido como possível ligante de GlnZ, tendo sido identificada na condição EI1 (aumento de 32x) e nas três condições de EI3 (EI3₁, EI3₂ e EI3₃, 3x aumentada, nas três condições). Além do fator sigma 54, foi identificada uma proteína não caracterizada, anotada como subunidade ômega da RNA polimerase (G8APW6, gene *rpoZ*) (250x aumentada em EI1 e ~30x em EI3), as subunidades α (G8AKN0) e β (G8AEM4) da RNA polimerase, com 45 e 63 vezes de aumento na condição GlnZ no ensaio EI1 e os fatores sigma RpoD (G8AN98; 32x) e RpoH (G8AN45; 23x). A subunidade β da RNA polimerase também foi identificada por espectrometria de massa (MALDI-TOF) nos ensaios EI1 e 3 (tabela 7). Em conjunto, estes dados sugerem que GlnZ poderia participar na regulação da atividade da RNA polimerase em *A. brasilense*.

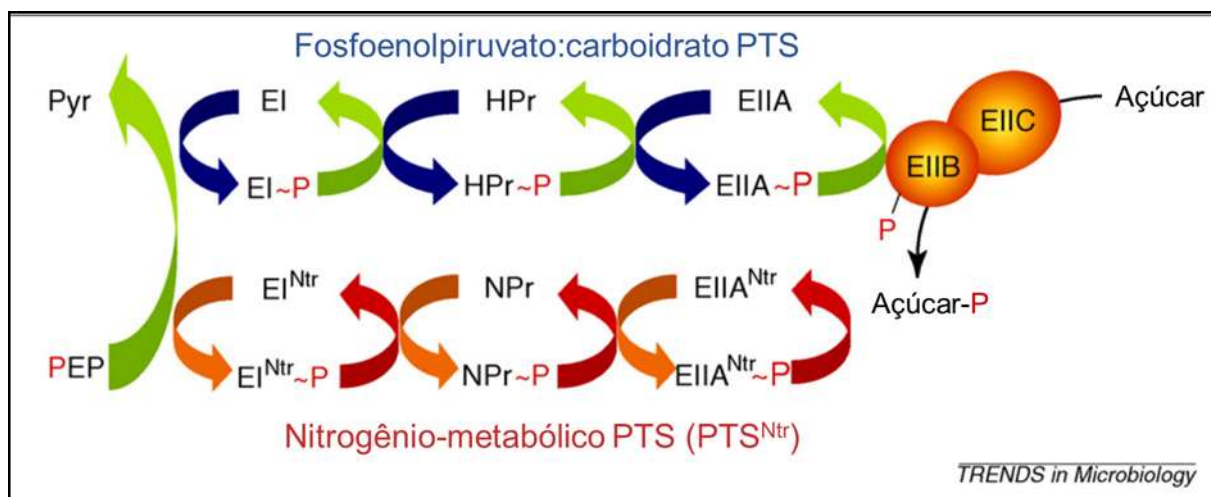


Figura 23 – Sistema paralelo de fosfotransferase em bactérias. Fonte: adaptado de PFLÜGER-GRAU; GÖRKE (2010)

G8AG60 está anotada como fator Rho de terminação de transcrição e foi identificado em todos os ensaios (EI1, 2 e 3), estando ~220 vezes aumentada em 2 condições de EI3. Fator Rho é um regulador global da expressão de genes bacterianos sob condições de crescimento normais. Os locais de terminação Rho-dependente ocorrem frequentemente em operons. Rho é responsável por manter limites transcripcionais ao longo do genoma. A função de Rho está relacionada a impedir que a transcrição de um operon interfira em operons vizinhos, para evitar o desperdício de produção de transcritos não utilizáveis e para reciclar polimerases e direcioná-las aos locais onde elas são necessárias (CARDINALE *et al.*, 2008). Em particular, Rho é responsável por silenciamento de elementos de DNA transferidos horizontalmente, alguns dos quais são prejudiciais para o hospedeiro (CARDINALE *et al.*, 2008).

Além do fator Rho, o fator de terminação/antiterminação NusA foi identificado em EI1. NusA já foi identificada como capaz de interagir com Rho e intermediar sua interação com RNAPol (SCHMIDT; CHAMBERLIN, 1984). NusA atua na terminação por interagir com estruturas em grampo (*hairpin*) que sinalizam parada ou terminação da transcrição, com igual probabilidade de alterar as respostas de RNAPol para sítios de pausa ou de terminação intrínsecas, independentemente do local onde estes sítios ocorrem no genoma (MOONEY *et al.*, 2009; BURMANN; RÖSCH, 2011). NusA aumenta preferencialmente a pausa transcripcional associada a grampos nascentes, aumenta a terminação intrínseca em alguns locais mais que

em outros, modula a terminação p-dependente e é um componente essencial de antiterminação de complexos que se formam em RNA ribossomal (rRNA) e operons de fagos λ (MOONEY *et al.*, 2009). Durante a síntese de RNA diversos reguladores de transcrição se ligam a RNAPol para garantir a processividade e estabilidade do complexo de elongação. NusA está entre as primeiras proteínas que interagem com a RNAPol depois da iniciação da transcrição (MOONEY *et al.*, 2009; BURMANN; RÖSCH, 2011).

Dois prováveis reguladores transcricionais foram identificados: G8AZ93 está classificada como proteína regulatória do transporte de C4-dicarboxilato (92x aumentada em EI1). Como proteínas PII ligam o ácido dicarboxílico 2-OG, é possível que estejam também envolvidas como controle transcricional do transporte de dicarboxilato. O outro regulador transcricional identificado é a proteína G8B008, anotada como regulador transcricional da família GntR de função desconhecida, estando aumentado 64x em EI1 e mais de 400 vezes em duas condições de EI3 (tabela 7). Esse gene se encontra adjacente ao operon que codifica para Glu-tRNA amidotransferase junto com duas proteínas hipotéticas. Em bactérias, Glu-tRNA é sintetizado pela ação de amidotransferases que catalisam a amidação de Glu-tRNA, utilizando glutamina como substrato (SHEPPARD *et al.*, 2008). O K_M de amidotransferases Glu-tRNA reportado em *E. coli* para glutamina é de $\sim 0,15 \mu M$ (Brenda Database), o qual é inferior aos níveis de glutamina para *A. brasilense* sob limitação de nitrogênio: $\sim 0,07 \mu M$ (E. C. Gerhardt and L.F. Huergo, dados não publicados). Consequentemente, poderia ser relevante fisiologicamente GlnZ regular a expressão de amidotransferases Glu-tRNA, via interação com a proteína G8B008, em resposta a limitação de glutamina, condição na qual a enzima poderia estar inativa por falta de substrato.

A proteína HflX (G8AQ33), identificada no ensaio EI1 (117x aumentada), é uma GTPase capaz de se associar com subunidade ribossomal 50S. Sua função específica ainda é desconhecida, mas ela parece estar envolvida no controle da tradução (JAIN *et al.*, 2009; FISCHER *et al.*, 2012). Outra GTPase associada com o ribossomo (Era) foi identificada como alvo de PII em *Rhodobacter capsulatus* através de ensaios utilizando o sistema duplo híbrido em leveduras (PAWLOWSKI *et al.*, 2003). Esse dado sugere que PII pode estar envolvida na regulação da função ribossomal e/ou sua biogênese. Curiosamente, uma pesquisa utilizando Pfam

identificou um domínio de ligação a GTP fusionado ao domínio PII em várias espécies de *Methanobacterium*, reforçando a hipótese de que PII poderia estar envolvida na clivagem ou sinalização de nucleotídeos guanosina.

G8APW7 (ppGpp sintetase - RelA) é uma enzima que catalisa a síntese de guanosina tetrafosfato (ppGpp) e sua atividade é induzida por limitação de aminoácidos e choque térmico. RelA é uma proteína associada ao ribossomo, que sensoria a limitação de aminoácidos por monitorar a capacidade de tradução da célula (Fig. 24). Por se ligar ao ribossomo, RelA consegue detectar o nível de tRNAs deacetilados (vazios) acumulados e isso leva a uma forte ativação da atividade de síntese de ppGpp por RelA (HASELTINE; BLOCK, 1973; HAURYLIUK *et al.*, 2015).

RelA atua juntamente com a proteína SpoT na síntese de ppGpp (através da adição de pirofostato a moléculas de GDP ou GTP), mas RelA atua apenas na síntese, enquanto SpoT atua na síntese e degradação, por apresentar um domínio bifuncional RSH (RelA-SpoT homólogo). ppGpps são conhecidos por seu efeito na resposta estrigente (alterações fisiológicas em resposta a diferentes estresses). O aumento na concentração de ppGpp pode ter efeitos diretos ou indiretos. Os indiretos são a alteração dos *pools* de GTP (depleção durante resposta estrigente, que leva à alteração do balanço de nucleotídeos e altera a preferência da RNA polimerase (RNAPol) por promotores). Em *B. subtilis*, há ainda a regulação indireta do repressor de expressão CodY, que inibe a expressão de mais de 100 genes relacionados a resposta a estresse (HAURYLIUK *et al.*, 2015). Os efeitos diretos de ppGpps incluem regulação da transcrição em *E. coli* via efeito na RNA polimerase (podendo alterar a expressão de diversos genes bem como a afinidade de RNA polimerase por diferentes fatores sigma) (CARNEIRO *et al.*, 2011), inibição na biossíntese de proteínas, inibição da replicação do DNA, inibição do metabolismo de polifosfato e inibição de resposta a estresse ácido, além de ligação a RelA, levando à regulação positiva de RelA e aumento na síntese de ppGpp (HAURYLIUK *et al.*, 2015).

Análises recentes realizadas por ChiP-seq em *E. coli*, utilizando NtrC-FLAG (principal regulador da resposta a estresse de nitrogênio, controlado por PII) indicaram que NtrC ativa a transcrição de *relA* a partir de um promotor sigma 54 em células com ausência de nitrogênio (BROWN *et al.*, 2014). Esse novo dado relaciona

a expressão da proteína RelA diretamente ao metabolismo de nitrogênio e reforça a hipótese de que RelA poderia ser regulada pela proteína PII.

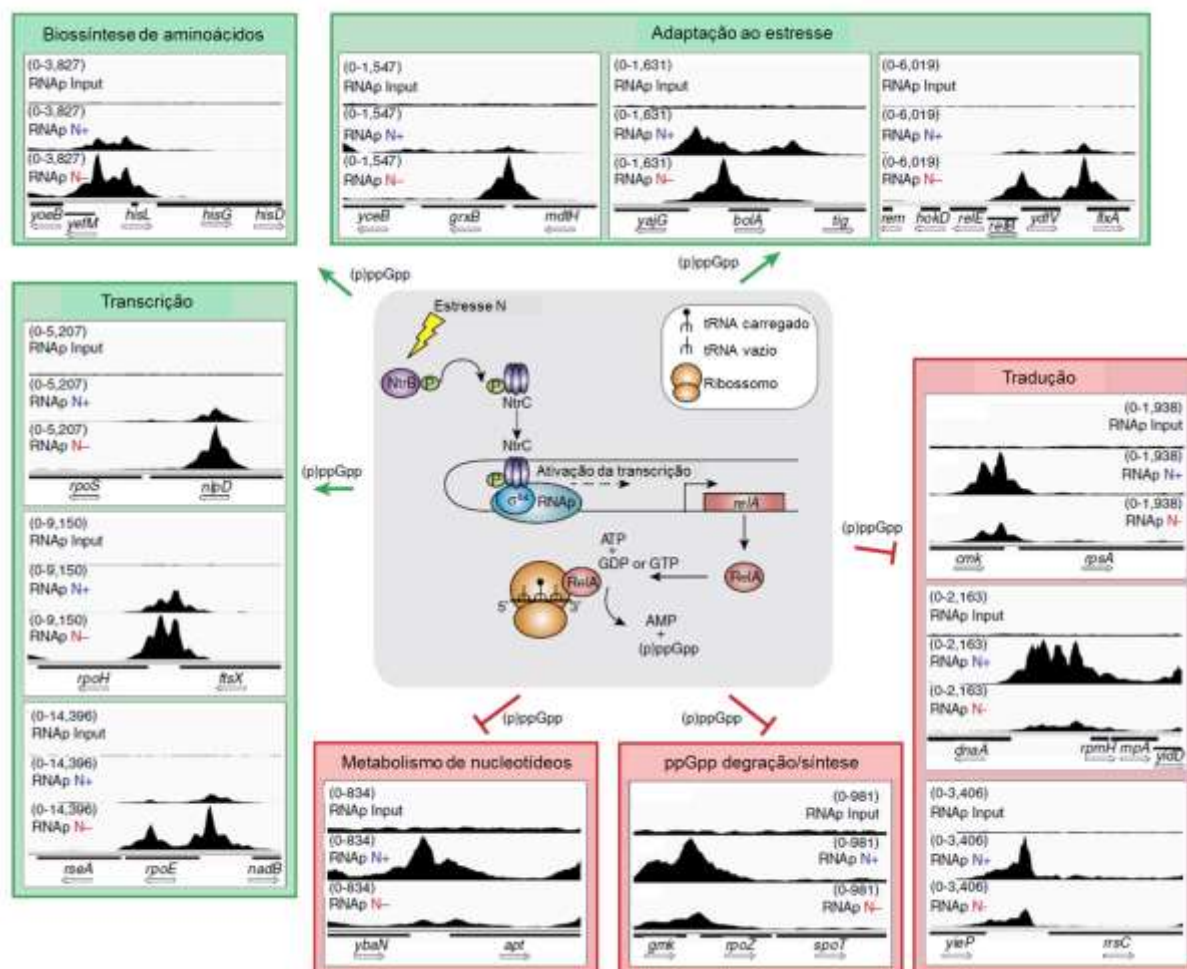


Figura 24 – Papel de RelA na resposta estrigente em *E. coli* em baixo nitrogênio. A figura no centro representa o modelo de como a escassez de nitrogênio é sentida, levando à ativação da transcrição de RelA mediada por NtrC, com aumento na síntese de ppGpp. Os quadros no entorno mostram os perfis de ligação da RNA polimerase a regiões promotoras responsivas a RelA. Vias ativadas são mostradas em verde e as reprimidas em vermelho. Adaptado de BROWN *et al.*, 2014.

A proteína orotato fosforibosiltransferase (G8AJG7; EC 2.4.2.10) (*pyrE*) foi identificada nos ensaios EI1 e 3 tanto por espectrometria de massa quantitativa sem marcação LC/MS/MS quanto por MALDI-TOF. Orotato fosforibosiltransferase participa da via de síntese de pirimidinas, levando à síntese de UMP. Em *E. coli*, o gene *pyrE* encontra-se em um operon com o gene *rph* (Ribonuclease PH – RNase PH). A transcrição do operon é UTP-sensível (altos níveis de UTP levam à repressão da transcrição desse operon (ANDERSEN; JENSEN; POULSEN, 1991)) e, além disso, o gene *rph* atua como uma sequência líder de atenuação de transcrição de *pyrE*,

que é o segundo gene do operon. (TURNBOUGH; SWITZER, 2008). Curiosamente, RNase PH (G8AGG4) também apareceu nos ensaios de interação, tanto nos ensaios com ATP quanto com ADP. Além de participar da regulação de Orotato fosforibosiltransferase, RNase também está envolvida na maturação de RNA e processamento de tRNA. Mais duas enzimas envolvidas no processamento de RNA (fig. 23) foram identificadas interagindo com GlnZ na presença de ATP: Ribonuclease R (G8AR84) e Ribonuclease G (G8ATG9). Todas as três RNases identificadas foram encontradas em ensaios com interação na presença de ATP e eluição na presença de ATP+2-OG (RNase PH foi encontrada também em ADP/ATP+2-OG). Em todos os casos, as RNases se dissociaram de GlnZ na presença de 2-OG. É possível que GlnZ se ligue a RNases quando há disponibilidade de nitrogênio, regulando negativamente sua atividade e, uma vez que a concentração de nitrogênio baixe, GlnZ se dissocia e com isso permite que as RNases realizem a degradação de mRNA, evitando síntese de novas proteínas e reciclando nitrogênio presente nos nucleotídeos.

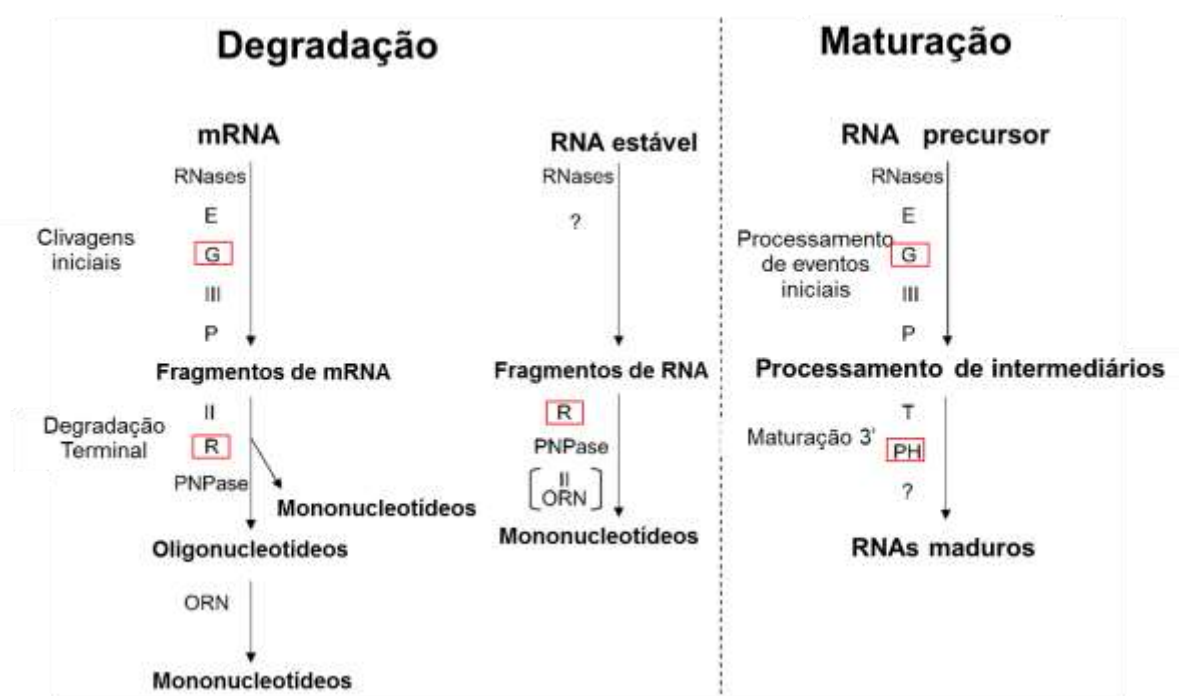


Figura 25 - Comparação da degradação de mRNA e RNA estável e maturação de RNA em *E. coli*. Retângulos vermelhos indicam as ribonucleases identificadas nos ensaios de interação de GlnZ e extrato de Ab2812. Fonte: adaptado de DEUTSCHER (2006).

Uma provável histidina quinase transdutora de sinal (G8AWC0) foi encontrada em todas as condições testadas (estando aumentada de 4 a 25 vezes na condição GlnZ - GlnZ/Ct). Análise do genoma de *A. brasilense* indica que o gene G8AWC0 está localizado em um operon juntamente com genes relacionados a quimiotaxia *cheC* e *cheY-like*. Além de G8AWC0, foi encontrada a proteína G8AMD0 (abundante no ensaio EI1), anotada como proteína de função desconhecida. Uma pesquisa de domínios de G8AMD0 no Pfam indicou 4 cópias de domínio pentapeptídeo (E-value 7×10^{-8} - 5×10^{-12}) e domínio PilZ na região C-terminal (E-value $1,3 \times 10^{-05}$). PilZ é um domínio de ligação c-di-GMP, e proteínas contendo esse domínio são conhecidas por interagir com proteína do complexo *switch* flagelar FliG e FliM (PAUL *et al.*, 2010). É interessante que a proteína FliM (G8ANG8) foi identificada na condição EI1, talvez até mesmo por estar interagindo com o domínio PilZ de G8AMD0. G8AJP1 (glicosilhidrolase) foi outra proteína identificada em EI1 que é descrita como regulada por proteínas com domínio PilZ de ligação a c-di-GMP. Uma pesquisa por *BlastP* indicou que proteínas similares a G8AMD0 são restritas a espécies de *A. brasilense*.

Foram ainda identificadas as proteínas G8AME0 e G8ATR8, classificadas como provável diguanilato ciclase (condições EI2 e 3). G8AMD0, G8AME0, G8ATR8 e G8AWC0 podem estar todas relacionadas ao controle de motilidade flagelar e/ou quimiotaxia. Há um precedente para o papel de proteínas PII na regulação da motilidade de bactérias em mutantes de *A. brasilense glnB-*, que são defeituosos no *swarming*, mesmo apresentando uma distribuição flagelar aparentemente intacta (DE ZAMAROCZY *et al.*, 1996). A presença de duas prováveis diguanilato ciclasas na lista de proteínas identificadas pode indicar uma interação de PII em *A. brasilense*. Diglanilato ciclase está envolvida na síntese de di-GMP cíclico (c-diGMP), um segundo mensageiro envolvido com a regulação de diversos processos metabólicos. Dentro as principais vias reguladas por c-di-GMP, destaca-se a transição de organismos sésseis a móveis (e *vice versa*), a formação de biofilmes, a alteração de fatores de virulência e modificação celular (JENAL; MALONE, 2006; RÖMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013). O controle da sinalização por c-di-GMP é pouco conhecido, mas acredita-se que ocorra um intrincado controle espacial e

temporal a nível transcricional, traducional e pós traducional (JENAL; MALONE, 2006).

5.3. Validação das proteínas obtidas nos ensaios de interação

Os resultados apresentados até então sugerem que a proteína GlnZ de *A. brasilense* poderia regular uma variedade de vias metabólicas através de interação proteína-proteína. Apesar da alta estringência dos ensaios de interação realizados, é possível que algumas das proteínas identificadas como possíveis alvos de GlnZ (tabela 7) sejam falsos positivos. Além disso, é possível que algumas das interações observadas sejam devido a interações indiretas. Para que as interações descritas na tabela 7 sejam confirmadas, são necessários experimentos de validação.

5.3.1. Ensaio de validação da interação entre as proteínas AbBCCP e GlnZ

Devido à importância da via de síntese de lipídeos, à descrição prévia na literatura da interação entre BCCP e PII em plantas, e devido a interação BCCP-GlnZ ter sido reproduzida em todos os ensaios realizados com ATP no tampão de interação e ATP + 2-OG no tampão de eluição (Tabela 7), optou-se por iniciar os experimentos de validação com a proteína BCCP.

O gene *accB* de *A. brasilense* FP2, que codifica a proteína BCCP, foi clonado e inserido nos plasmídeos pET-28a (N-terminal His-BCCP) e pT7-7 (BCCP nativa). Os plasmídeos foram transformados em *E. coli* BL21 (λ DE3), e as proteínas foram expressas e purificadas (Fig. 26-28), conforme descrito nos itens 4.19.2 e 4.19.3.

A proteína His-BCCP foi purificada seguindo protocolo padrão para purificação de proteínas com 6xHis-tag. Entretanto, parte do *pool* de proteínas não se ligou à coluna HiTrap His, mesmo após uma segunda injeção na mesma coluna (NL1 e NL2 fig. 26A) ou injeção da fração não ligada em uma nova coluna (NL – fig. 26B). Mas,

mesmo com grande quantidade da proteína permanecendo na fração não ligada, a proteína His-BCCP foi purificada com boa concentração.

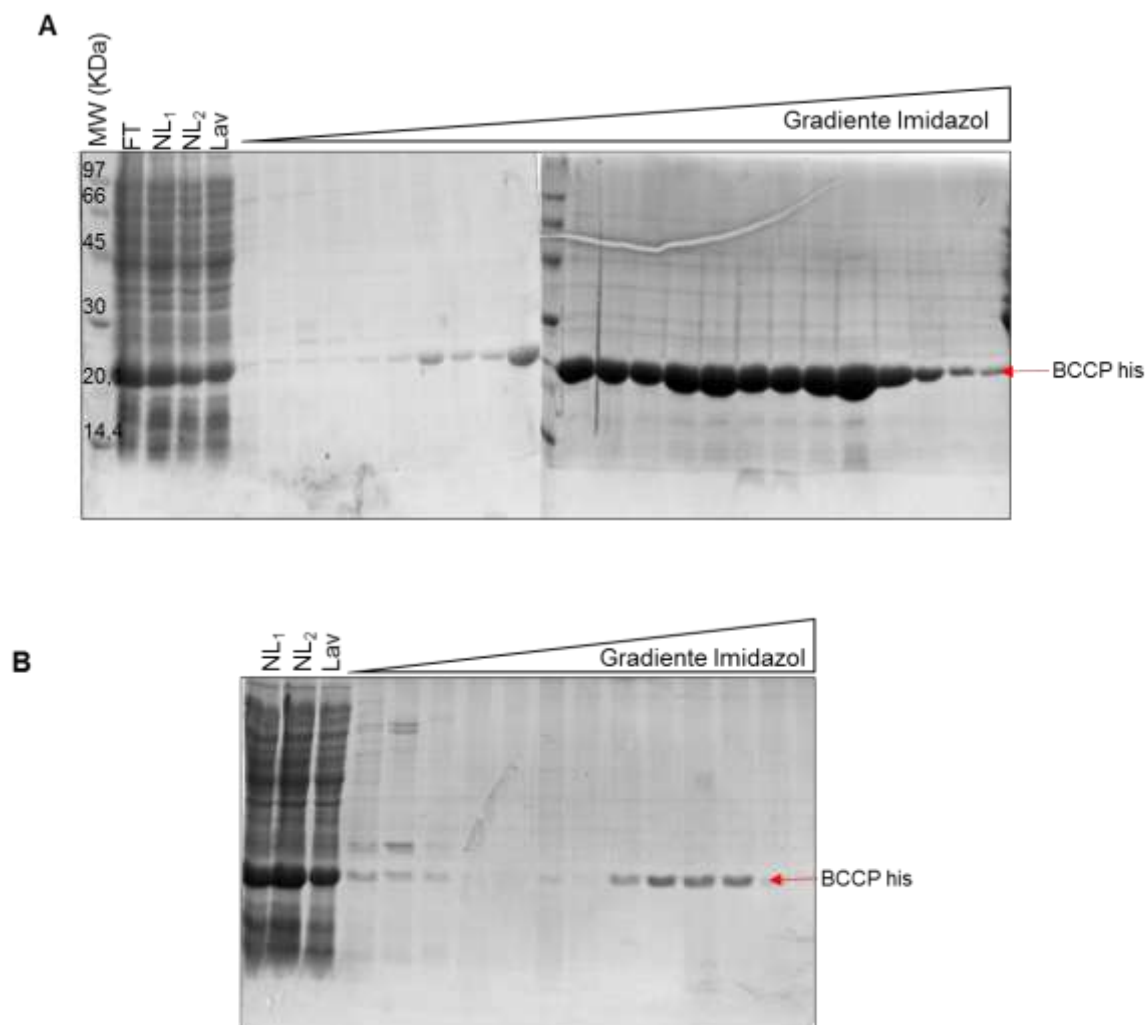


Figura 26 - Perfil eletroforético das frações obtidas durante a purificação de AbBCCP-His. (A) Fração total (solúvel) foi aplicada na coluna HiTrap *Chelating*. A fração não ligada foi injetada novamente antes da eluição. Eluição foi realizada com gradiente de 10 a 500 mM de imidazol em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e NaCl 100 mM. **(B)** fração NL₂, obtida na primeira purificação, foi injetada novamente na coluna HiTrap *Chelating*. Perfil eletroforético das frações contendo AbBCCP-His observado por SDS-PAGE, gel 12,5%. FT – fração total. NL – fração de lavagem (não ligada à coluna). MW indica o marcador de massa molecular em kDa. Gel corado com Coomassie Blue. Fonte: a autora.

Monômeros de BCCP de *A. brasiliense* (AbBCCP) tem massa molecular aproximada de 17 kDa, embora em géis SDS-PAGE ela se comporte como uma proteína de maior massa molecular (~22 kDa). Essa diferença de migração foi explicada por Li e Cronan (1992) para *E. coli* como decorrente de uma região rica em resíduos de arginina e prolina entre os resíduos 34 a 101 de BCCP de *E. coli* (EcBCCP), característica comum de proteínas com domínio biotinoil/lipoil. AbBCCP,

assim como EcBCCP, possui essa região rica em Arg/Pro. BCCP é descrita na literatura como provável dímero, mas com grande tendência a agregação (NENORTAS; BECKETT, 1996; CRONAN, 2001; CRONAN JR.; WALDROP, 2002). Análise de His-BCCP por DLS indicou que a proteína em solução estava homogênea, porém, formando estruturas de alto peso molecular (~800 KDa). Esses oligômeros de alto peso molecular são comumente encontrados nas purificações de EcBCCP, apresentando massas superiores a 640-800 KDa (FALL; VAGELOS, 1972; NENORTAS; BECKETT, 1996).

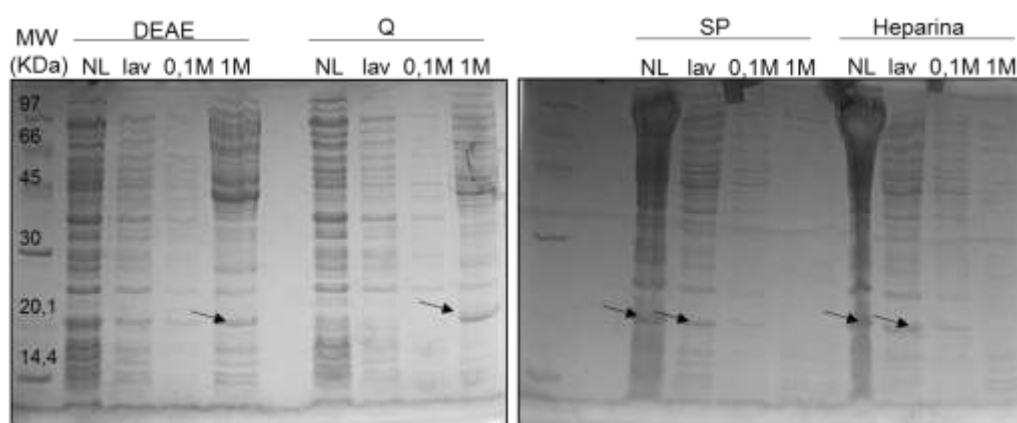


Figura 27 – Avaliação de diferentes resinas para purificação da proteína AbBCCP. Foram utilizadas as resinas DEAE sepharose, Q sepharose, SP sepharose e Heparina sepharose. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 12,5% das frações proteicas NL – Não ligada à resina; lav – proteínas não adsorvidas à resina, lavadas com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5; 0,1M e 1M – eluição com Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e 0,1 M ou 1 M de NaCl. Diferentes resinas foram testadas quanto à capacidade de ligação de AbBCCP nativa. As setas indicam a proteína AbBCCP. MW indica o marcador de massa molecular em KDa. Fonte: a autora.

Para a proteína BCCP nativa, foi necessário o estabelecimento de um protocolo de purificação. Foram testadas as resinas SP sepharose, Q sepharose, DEAE sepharose, Heparina sepharose (Fig. 27) e CM sepharose (dados não mostrados) (todas as resinas: GE Healthcare). A suspensão celular contendo BCCP foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, sonificada e o extrato celular foi centrifugado. O sobrenadante da centrifugação foi dividido em 5 frações de 5 mL, cada uma delas utilizada para testar uma resina diferente. O extrato contendo BCCP foi adicionado a 1,5 mL a cada resina, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Foram coletadas aliquotas da fração não ligada (NL), da lavagem com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, lavagem com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e NaCl 100 mM e eluição com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e NaCl 1 M. BCCP

nativa ligou-se parcialmente à resina DEAE e, com um pouco mais de afinidade, à resina Q FF, o que pode ser observado comparando-se a quantidade de BCCP eluída na fração 1M (linhas 1M de DEAE e Q na figura 27). Desse modo, a resina Q FF foi selecionada para a etapa posterior.

A purificação de BCCP nativa na coluna Q FF foi realizada com gradiente de NaCl. Assim como a proteína His-BCCP, grande parte do *pool* de proteínas permaneceu na fração não ligada. BCCP foi eluída a partir de 250 mM de NaCl, porém, muitas outras proteínas foram eluídas nas mesmas frações que BCCP, sendo necessária uma etapa de gel filtração (Fig. 28).

A eluição de AbBCCP na coluna de gel filtração Sephacryl S200 26/60 de 320 mL (GE Healthcare) foi próxima ao volume morto da coluna, indicando uma proteína com alta massa molecular (~800 KDa), similar à observada para His-BCCP por DLS. Entretanto, após gel filtração, apenas 10 frações continham BCCP com menos contaminantes (mas não completamente pura) e bastante diluída. Embora o protocolo tenha funcionado para a purificação de BCCP, não foi possível a obtenção de uma proteína purificada com alto rendimento.

É interessante destacar que tanto a proteína AbBCCP nativa quanto AbBCCP-His apresentaram a mesma característica de formação de oligômeros já descrita para EcBCCP. A formação dessa estrutura parece estar associada à região N-terminal de BCCP, pois em ensaios realizados com a proteína truncada BCCP-87 (contendo apenas os 87 aminoácidos da região C-terminal) a proteína permaneceu monomérica em todas as etapas analisadas (CHAPMAN-SMITH *et al.*, 1994; NENORTAS; BECKETT, 1996).

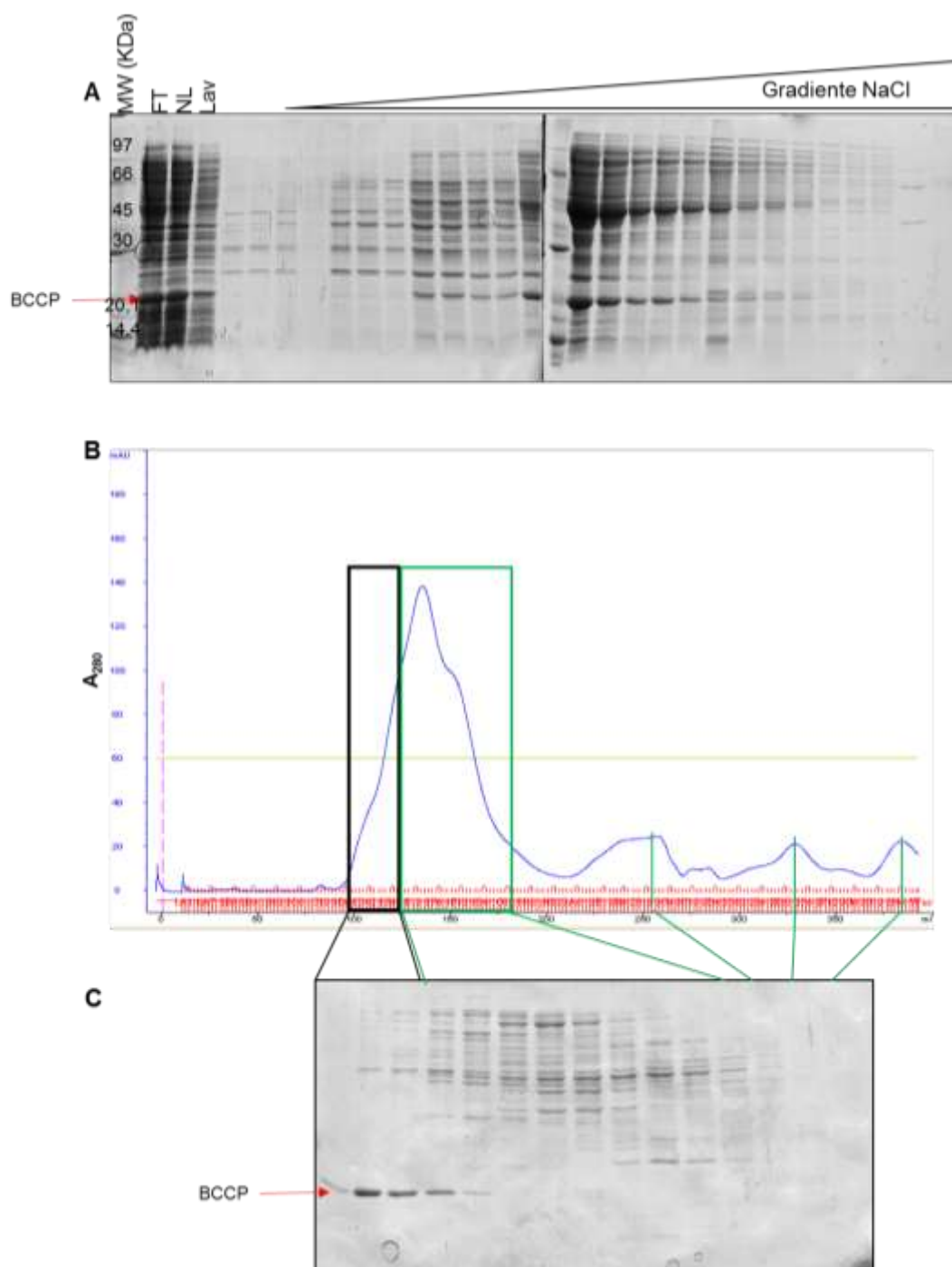


Figura 28 - Perfil eletroforético das frações obtidas na purificação de AbBCCP nativa. Perfil eletroforético para as frações obtidas com a eluição na coluna Q sepharose com gradiente linear de NaCl de 0,1 a 1 M em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 **(A)** e Gel filtração Sephacryl S200 26/60 320 mL **(C)**. Perfil de eluição obtido na gel filtração **(B)**. AbBCCP foi inicialmente purificada utilizando a coluna Q sepharose, com eluição com gradiente de 0 a 500 mM de NaCl **(A)**, e as frações que continham mais AbBCCP foram agrupadas e injetadas na coluna de gel filtração Sephacryl S200, com eluição com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 100 mM e glicerol 10%. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5%. FT – fração total. NL – fração de lavagem (não ligada à coluna). Lav – lavagem. Quadro e linhas pretas em **(B)** e **(C)** indicam as frações que continham mais AbBCCP, enquanto quadro e linhas verdes indicam os demais picos observados na gel filtração. Setas vermelhas indicam AbBCCP nos géis. MW indica o marcador de massa molecular em KDa. Gel corado com Coomassie Blue. Fonte: a autora.

A análise por espectrometria de massa também não identificou BCCP biotinilada. A massa molecular de AbBCCP é 15 KDa para a proteína nativa e 16 KDa para a proteína His (embora no gel SDS-PAGE ela apresente migração superior a 20 KDa). A adição de biotina confere um acréscimo de 244 Da, que pode ser detectado por espectrometria de massa tipo MALDI-TOF, indicando qual população se encontra biotinilada e qual está em sua forma apo. O espectro obtido para His-BCCP indicou a presença de apenas uma população, com massa 17331 Da (fig. 29). A massa 8657,923 corresponde à massa $M+2H^+$. Como a análise por *western blotting* indicou que apenas uma pequena parte de BCCP estava biotinilada, os dados obtidos com espectrometria de massa mostram apenas a população de BCCP não modificada, na sua forma de apoproteína. É possível que AbBCCP não seja reconhecida por EcBirA como substrato de forma eficiente ou talvez os parâmetros utilizados na reação de biotinylation não tenham sido adequados, sendo necessária a otimização da reação.

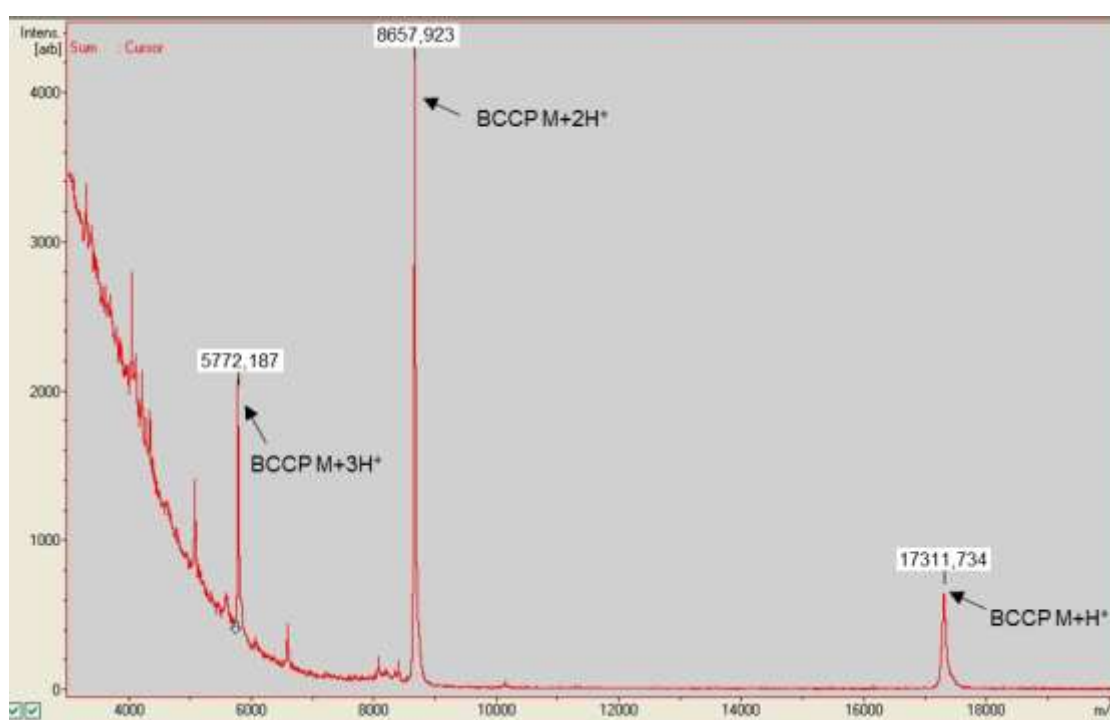


Figura 29 - Perfil obtido para proteína AbBCCP His em análise por MALDI-TOF. Fonte: a autora.

É comum a utilização da proteína biotina ligase (BirA) de *E. coli* para biotinylation de BCCP *in vitro*. Dentre as proteínas eficientemente biotiniladas *in vitro*

está a ACCA3 de *M. tuberculosis*. ACCA3 possui as funções catalítica de BC e BCCP em um único peptídeo (enquanto em *E. coli* e *A. brasilense* BC e BCCP são proteínas independentes). A similaridade entre ACCA3 e EcBCCP é baixa se considerada toda a proteínas ACCA3, mas é de 55% se considerada apenas a região da proteína equivalente a BCCP, com 68% de similaridade com EcBCCP. AbBCCP possui 45% de identidade com EcBCCP e 59% de similaridade, mas, diferentemente de ACCA3, não foi eficientemente biotinilada *in vitro* por EcBirA. Beckett, Kovaleva e Schatz (1999) verificaram que os resíduos nas posições -2, -3, -5 e +2, em relação à lisina (Lys122), são críticos para uma biotinilação eficiente em *E. coli*. Esses aminoácidos são conservados em diversas sequências de BCCP e são conservados para ACCA3. Entretanto AbBCCP não apresenta a sequência MKM, tendo a posição da segunda metionina ocupada por uma valina (V). Desse modo, é possível que metionina (MKM) posterior à Lys22 seja essencial à reação de biotinilação catalisada por BirA. É possível ainda que a ausência de biotinilação de AbBCCP se deva à estrutura espacial da proteína oligomérica assumida pela AbBCCP.

As proteínas purificadas foram utilizadas em ensaios de interação BCCP-His-GlnZ e GlnZ-BCCP-Hhis. Foram realizados ensaios de coprecipitação com resina magnética, com resina ligada à estreptavidina e análise por gel nativo, mas nenhuma interação foi detectada *in vitro* (dados não mostrados). Essa ausência de interação pode ser decorrente da ausência de biotinilação efetiva nas BCCPs de *A. brasilense*.

Como não foi possível a obtenção de AbBCCP biotinilada *in vitro*, optou-se por testar o sistema de biotinilação primeiramente em *E. coli* e otimizar as condições de ensaio neste organismo. Dessa forma, devido à disponibilidade de todas as subunidades de Acetil-CoA carboxilase de *E. coli* em nosso laboratório (plasmídeos para His-BCCP, His-BC e His-CT foram gentilmente cedidos pelo Dr. Aileen Soriano (SORIANO *et al.*, 2006) e plasmídeo para BirA pela Dra. Anne Chapman-Smith (CHAPMAN-SMITH *et al.*, 1994)), optou-se pela continuação da caracterização da interação PII-BCCP utilizando o EcACC como modelo.

Visto que os ensaios de validação da interação GlnZ-BCCP não foram realizados com AbBCCP devido à ausência de biotinilação *in vitro* (e logo, de uma BCCP funcional), todos os ensaios de caracterização foram feitos inicialmente com

EcBCCP e, em seguida, com EcACC reconstituída (BC, BCCP e CT). Ensaios iniciais de caracterização da formação do complexo foram padronizadas em ensaios de co-precipitação utilizando EcBCCP e EcPII e AbPII. Estes ensaios foram realizados em parceria com o doutorando Thiago E. Rodrigues (mestrando, quando do início do projeto).

Os ensaios iniciais obtidos por Rodrigues e colaboradores (2014) indicaram que BCCP co-precipitava com as formas His-tag de EcGlnK, EcGlnB, AbGlnZ e na presença de ATP, e que o complexo era desfeito na presença de 2-OG, de forma dose dependente. Esses dados estão de acordo com as condições em que BCCP foi encontrada interagindo com GlnZ (EI1).

Para verificar o efeito de PII sobre a atividade de ACC, optou-se pela realização de ensaios de atividade de ACC, em paralelo com a caracterização por ensaios de co-precipitação (ensaios de co-precipitação realizados por Rodrigues, T. E.).

5.4. Estabelecimento de um protocolo para medir a atividade de ACC *in vitro*

A enzima acetil-CoA Carboxilase (ACC) é composta por três diferentes proteínas denominadas carboxil transferase (CT), biotina carboxilase (BC) e proteína carreadora de carboxil biotina (BCCP) (fig. 30A). Resultados anteriores obtidos por ensaios de interação *in vitro* utilizando proteína GlnZ purificada e extrato de *A. brasilense* apontaram a interação da proteína PII, GlnZ, com o componente BCCP da acetil-CoA carboxilase. Ensaios de co-precipitação com proteínas purificadas indicavam que as proteínas GlnB e GlnK de *E. coli* e GlnB e GlnZ de *A. brasilense* podem interagir com BCCP de *E. coli* quando na presença de MgATP (RODRIGUES *et al.*, 2014). Entretanto, não havia nenhuma informação a respeito de como essa interação afeta a atividade de ACC em bactérias. A única informação descrita a respeito da interação entre PII e BCCP foi obtida em plantas. Em *A. thaliana*, foi observado que PII pode inibir a atividade de ACC em até 50% em extratos de cloroplasto (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010).

A fim de caracterizar a interação de PII e BCCP e como isso interfere na atividade de ACC, um protocolo para medir a atividade enzimática de ACC foi adaptado para essa proteína (BEEZ *et al.*, 2009; BROUSSARD *et al.*, 2013b). A atividade de ACC ocorre em duas etapas, como mostrado na figura 30. Inicialmente, BC adiciona um grupo carboxil proveniente do bicarbonato à biotina ligada a BCCP com a utilização de uma molécula de ATP. Na segunda etapa, CT (heterotetrâmero formada por 2 subunidades α e 2 β) catalisa a transferência do grupo carboxil ligado à biotina para uma molécula de acetil coenzima A (acetil-CoA), gerando malonil-CoA que é o substrato utilizado nas etapas seguintes da síntese de ácidos graxos. Como na primeira etapa há utilização de ATP, gerando ADP, o ADP resultante pode ser utilizado numa reação acoplada com piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH) que utilizam o ADP como substrato para síntese de ATP na etapa 1 e NADH para a redução do piruvato a lactato na etapa 2 (Fig. 30B). Dessa forma, cada reação catalisada por ACC gera 1 ADP e 1 malonil-CoA e cada ADP gerado equivale a 1 NADH oxidado a NAD^+ que pode ser monitorado em espectrofotômetro a 340 nm.

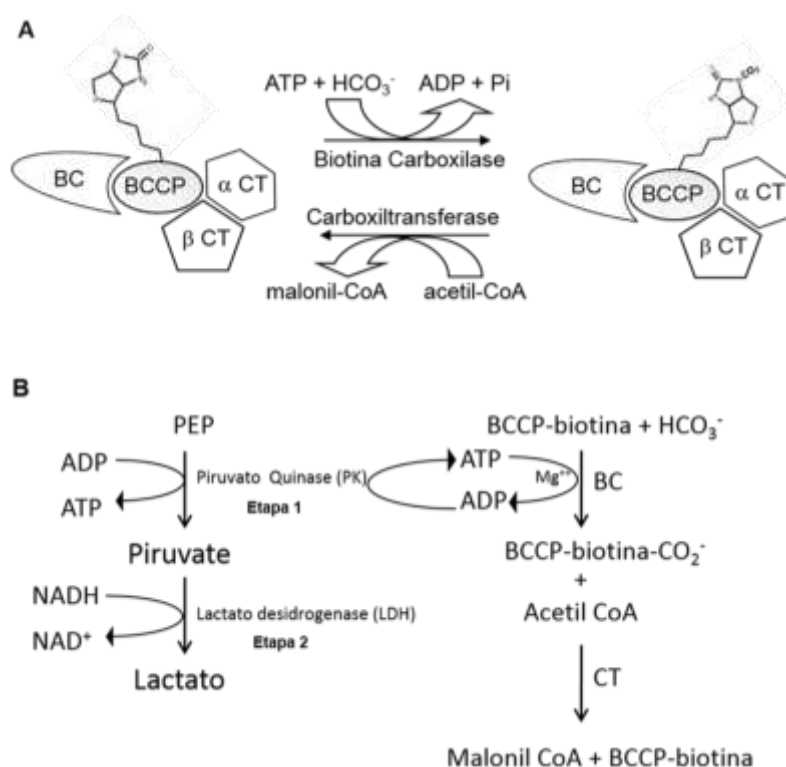


Figura 30 – Reação catalisada pela enzima Acetil-CoA carboxilase. A- Subunidades e reação catalisada por BCCP (Fonte: Rodrigues *et al.*, 2014). B- Reação enzimática de ACC acoplada a Piruvato quinase e Lactato desidrogenase (Fonte: a autora).

Ensaio iniciais foram realizados a fim de determinar as melhores condições para a atividade de ACC. Foram testadas diferentes concentrações de Acetil-CoA, de bicarbonato de sódio, diferentes pHs e diferentes tampões (dados não mostrados). A melhor atividade foi obtida utilizando-se 10 mM de NaHCO₃, 400 µM de acetil-CoA, tampão imidazol-bicarbonato, e pH final da reação de 7,5. Quanto à concentração das subunidades de ACC, foram usadas 10 nM de CT (tetrâmero), 20 nM de BC (dímero) e 400 nM de BCCP (monômero).

5.5. Efeito de diferentes proteínas PII na atividade de ACC

Resultados obtidos por co-precipitação indicaram que tanto GlnB quanto GlnK de *E. coli* e *A. brasilense* (GlnZ e GlnB) são capazes de interagir com BCCP (RODRIGUES *et al.*, 2014). As proteínas GlnB de *E. coli* (EcGlnB), *A. brasilense* (AbGlnB) e *Synechococcus elongatus* (SeGlnB) e GlnK de *E. coli* (EcGlnK), GlnZ de *A. brasilense* (AbGlnZ) e GlnK de *Bacillus subtilis* (BsGlnK) (gentilmente cedida pela Dra. Ksenia Fedorova – Tübingen Universität) foram testadas com EcACC para verificar se apresentavam algum efeito sobre a atividade de ACC. Foi verificado que apenas GlnB (EcGlnB, ABGlnB e SeGlnB) é capaz de inibir a atividade de ACC (Fig. 31), e que GlnZ e GlnK, embora interajam com BCCP, não apresentam efeito sobre ACC. EcGlnB, AbGlnB e SeGlnB foram capazes de inibir a atividade de ACC em 40, 72 e 74% respectivamente, enquanto EcGlnK, AbGlnZ e BsGlnK não foram capazes de inibir a atividade de ACC (Fig. 31). Os dados obtidos sugerem que esse mecanismo de regulação de ACC é conservado em diferentes organismos, uma vez que foi observada inibição de EcACC por GlnB de γ -proteobactéria (*E. coli*), α -proteobactéria (*A. brasilense*) e cianobactéria (*S. elongatus*).

Os resultados obtidos indicam que GlnK e GlnZ não são capazes de inibir a atividade de ACC. Entretanto, essas proteínas interagem *in vitro* com BCCP (RODRIGUES *et al.*, 2014). Essa discrepância pode ser explicada pelo fato de que, nos ensaios de co-precipitação realizados inicialmente *in vitro*, foi testada apenas a interação de PII-His com BCCP purificada. Ensaios de co-precipitação realizados

recentemente em nosso laboratório utilizando BC-His+BCCP e PII, indicam que apenas GlnB pode se ligar ao complexo BC-BCCP (Thiago E. Rodrigues, comunicação pessoal). Esses dados estão de acordo com os dados obtidos para a atividade de ACC (Fig. 31), onde, para se determinar a atividade de ACC, foram utilizadas as 3 subunidades (CT, BC e BCCP) para se obter uma ACC ativa. É provável que a ligação de BCCP a BC torne a ligação de BCCP a PII mais específica, ou por gerar alguma alteração conformacional ou por tornar indisponível alguma região de BCCP que seja necessária para a ligação de GlnK (ou GlnZ). Isso indica que, fisiologicamente, GlnB, e não GlnK ou GlnZ, está relacionada à regulação da atividade de ACC.

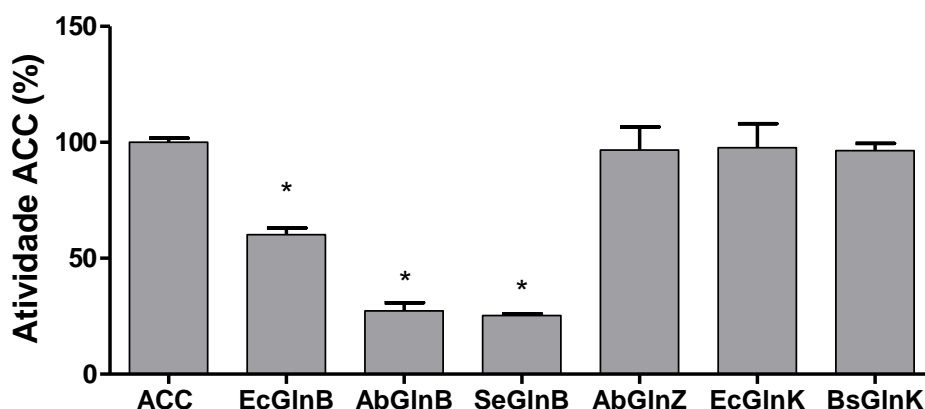


Figura 31 -Efeito de diferentes PII na atividade de ACC de *E. coli*. A atividade de ACC foi medida por ensaio enzimático acoplado na presença ou ausência de 20 µg de PII. O resultado é apresentado em % de atividade de ACC, sendo atividade de ACC sem PII considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em triplicata. Ec – *Escherichia coli*; Ab – *Azospirillum brasilense*; Se – *Synechococcus elongatus*; Bs – *Bacillus subtilis*. * indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (ACC) (teste t paramétrico não pareado – GraphPad Prism 6). As barras de erro indicam o desvio padrão da média das amostras. Fonte: a autora.

Foi verificado ainda que a inibição de ACC ocorre de maneira dose dependente da concentração de GlnB (Fig. 32A). Os dados obtidos com as curvas de concentração de GlnB indicam que AbGlnB e SeGlnB tem maior eficiência inibitória sobre EcACC que EcGlnB. A inibição máxima calculada foi de 90, 93 e 49% respectivamente (Fig. 32B), enquanto a quantidade de GlnB necessária para 50% de seu efeito máximo na atividade de ACC (EC50) foi de 0,43 (Ab), 0,31 (Se) e 0,81 µM

(Ec), sugerindo que AbGlnB e SeGlnB são mais eficientes na inibição de ACC que EcGlnB.

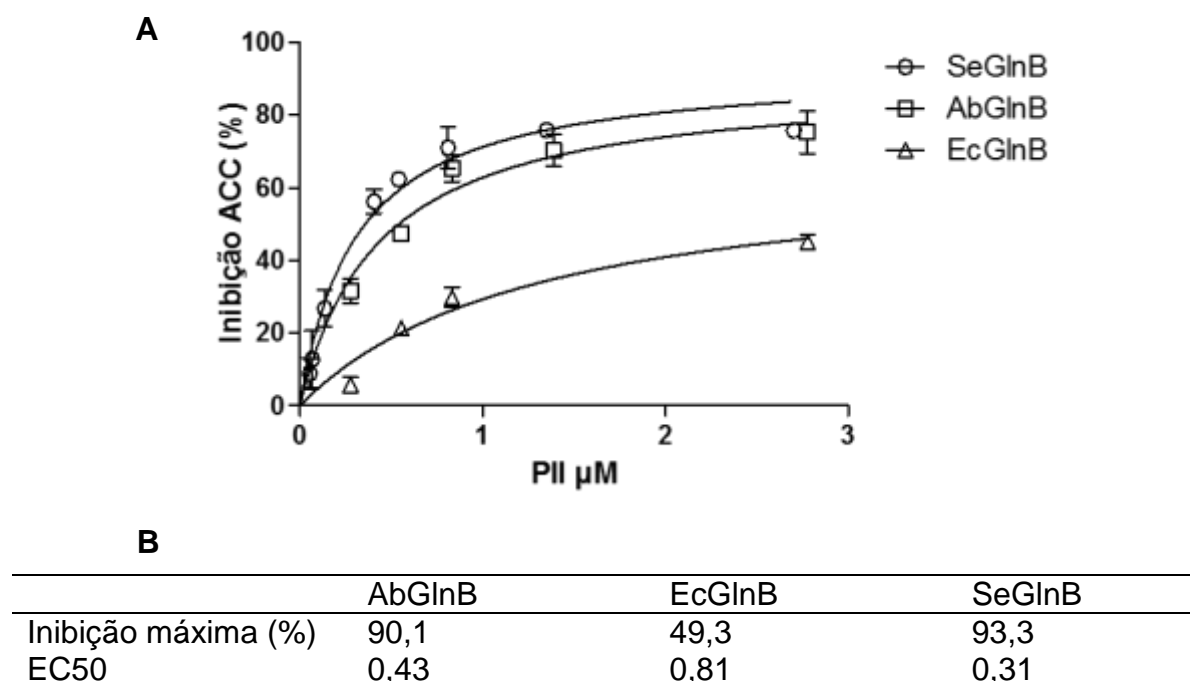


Figura 32 – Efeito de diferentes concentrações de PII na atividade de ACC de *E. coli*. (A) Efeito inibitório de diferentes concentrações de GlnB de *A. brasilense*, *E. coli* e *S. elongatus* na atividade de EcACC. A atividade de ACC foi medida por ensaio enzimático acoplado na presença ou ausência de PII. (B) Concentração de PII (μM) necessária para atingir 50% de seu efeito inibitório máximo sobre ACC. O resultado em A é apresentado em % de inibição de ACC, sendo atividade de ACC sem PII considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os valores de EC50 foram obtidos pelo programa GraphPad Prism. Ec – *Escherichia coli*; Ab – *Azospirillum brasilense*; Se – *Synechococcus elongatus*. As barras de erro indicam o desvio padrão da média das amostras. Fonte: a autora.

5.6. Efeito de 2-OG na interação de GlnB e ACC

Proteínas PII são capazes de ligar ATP, ADP e 2-OG e responder a ligação desses metabólitos com mudanças conformacionais, que interferem diretamente na interação de PII com proteínas alvo. Ensaios de co-precipitação indicaram que a ligação de PII com BCCP ocorre na presença de ATP, mas não de ADP ou ATP + 2-OG (RODRIGUES *et al.*, 2014). Para verificar o papel de 2-OG na interação de GlnB e ACC, foram realizados ensaios na ausência ou presença de 2-OG nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mM, na presença de AbGlnB ou EcGlnB (Fig. 33).

Foi observado que o efeito inibitório de GlnB sobre ACC é revertido na presença de 2-OG de maneira dose dependente, sendo que na presença de 1 mM de 2-OG a inibição de ACC foi completamente revertida tanto quando na presença de EcGlnB (Fig. 33A) quanto AbGlnB (Fig. 33B).

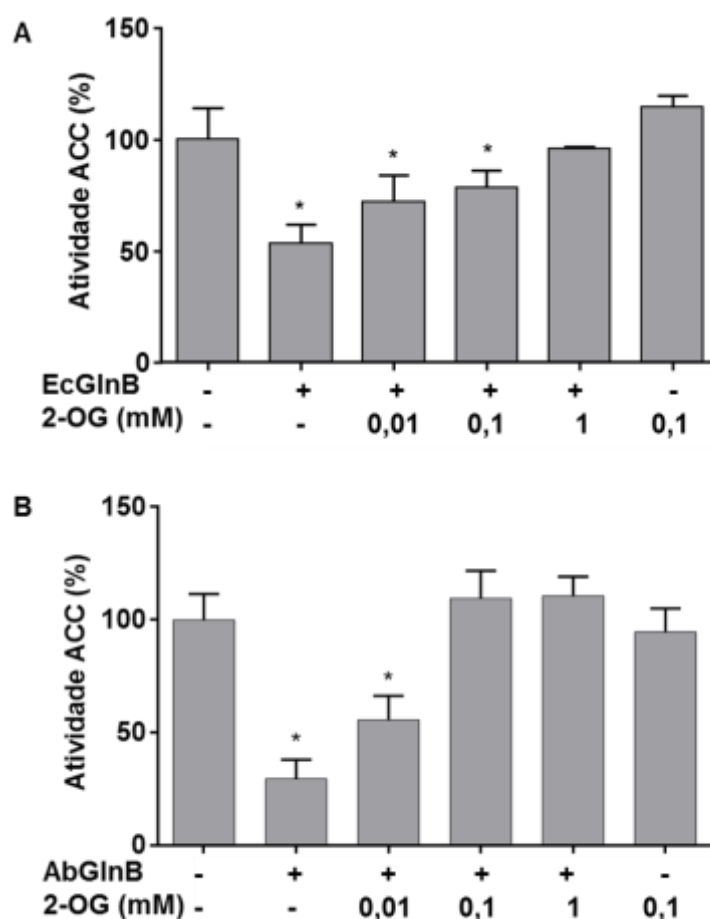


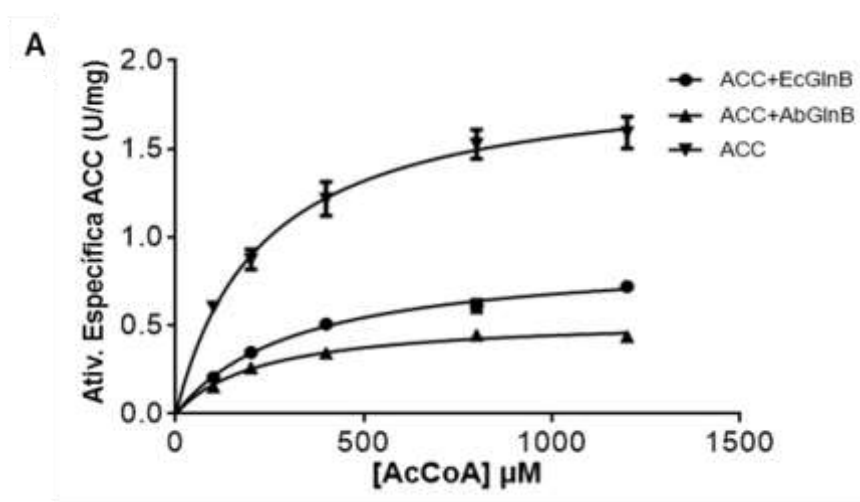
Figura 33 - Efeito de 2-oxogutarato (2-OG) na inibição de ACC por PII. Atividade de ACC na presença de **(A)** EcGlnB e **(B)** AbGlnB e 2-OG. A atividade de ACC foi medida por ensaio enzimático acoplado na presença ou ausência de 20µg de PII e ausência ou presença de 2-OG nas concentrações indicadas. O resultado é apresentado em % de atividade de ACC, sendo atividade de ACC sem PII considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em quintuplicata. * indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (ACC) (teste T paramétrico não pareado – GraphPad Prism 6). As barras de erro indicam o desvio padrão da média das amostras. Fonte: a autora.

A reversão da inibição de ACC na presença de 2-OG tem uma explicação fisiológica. A concentração de 2-OG pode ser relacionada à concentração de nitrogênio mas pode também indicar os níveis de carbono da célula, uma vez que essa molécula faz parte do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (COMMICHAU;

FORCHHAMMER; STÜLKE, 2006). Como ACC é uma enzima chave na síntese de ácidos graxos, sua atividade depende da presença de carbono suficiente na célula. Quando o nível de carbono está baixo, a concentração de 2-OG é baixa e, assim, GlnB pode se ligar a ACC, inativando-a parcialmente. Uma vez aumentada a concentração de carbono intracelular, a concentração de 2-OG aumenta, levando a alterações conformacionais de GlnB e consequente dissociação do complexo GlnB-ACC, tornando ACC novamente ativa.

5.7. Efeito de GlnB nos parâmetros cinéticos de ACC

A fim de determinar o mecanismo pelo qual GlnB afeta a atividade de ACC, foram realizados ensaios de cinética enzimática com variação de substrato (Acetil-CoA) (Fig. 34). Os dados obtidos indicam que GlnB altera de forma mais evidente a velocidade máxima da reação de ACC, indicada na figura 34A como atividade específica. O valor de K_M obtido para Acetil-CoA foi de 228 μM na ausência de PII, 227 μM na presença de AbGlnB e 321 μM na presença de EcGlnB (Fig. 34B). Os valores obtidos estão de acordo com os valores de K_M depositados para ACC de bactérias do banco de dados BRENDA. EcGlnB causou uma pequena alteração no K_M (de 228 para 321 μM de Acetil-CoA), mas a maior diferença observada foi nos valores de K_{cat} obtidos, indicando que a presença de GlnB altera a constante catalítica de ACC e sua taxa de renovação, sendo que a presença de EcGlnB diminuiu o valor de K_{cat} pela metade e a presença de AbGlnB diminuiu 3 vezes o valor de K_{cat} . Os dados publicados para *A. thaliana* mostraram o mesmo efeito, com alteração na velocidade da reação mas não o K_M da enzima para o substrato acetil-CoA (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010).



B

	K_M (μM)	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_M
ACC	228	4,40	0,0193
ACC+EcGlnB	321	2,05	0,0064
ACC+AbGlnB	227	1,25	0,0055

Figura 34 – Efeito de GlnB nos parâmetros cinéticos de ACC. (A) A atividade de ACC foi medida por ensaio enzimático acoplado na ausência e presença de 20μg de AbGlnB ou EcGlnB como indicado com variação na concentração de Acetil-CoA (AcCoA). Os ensaios foram realizados em duplicata e o desvio padrão da média das amostras é indicado pela barra de erros. A atividade específica foi calculada com base na concentração de CT. **(B)** Valores de K_M e K_{cat} foram obtidos através do ajuste dos dados na equação de Michaelis-Menten através do programa GraphPad Prism. Fonte: a autora.

5.8. Efeito da uridililação de GlnB na atividade de ACC

Em proteobactérias, proteínas PII também sofrem regulação pós-traducional por modificação do resíduo tirosina 51. Em *A. brasilense* e *E. coli*, essa modificação se dá por uridililação e essa modificação é importante para modulação da interação de PII com proteínas alvo. Para verificar se a adição de grupos UMP a GlnB interfere na formação do complexo GlnB-ACC, proteínas GlnB de *A. brasilense* e *E. coli* foram completamente uridililadas e seu efeito comparado às proteínas sem modificação (Fig. 35). Foi verificado que GlnB uridililada não foi capaz de inibir a atividade de ACC, tanto para EcGlnB (Fig. 35A) quanto para AbGlnB (Fig. 35B). Isso sugere que a presença do grupo uridilil no *loop* T de GlnB impede o efeito inibitório de GlnB sobre ACC, talvez por impedir a formação do complexo GlnB-BCCP.

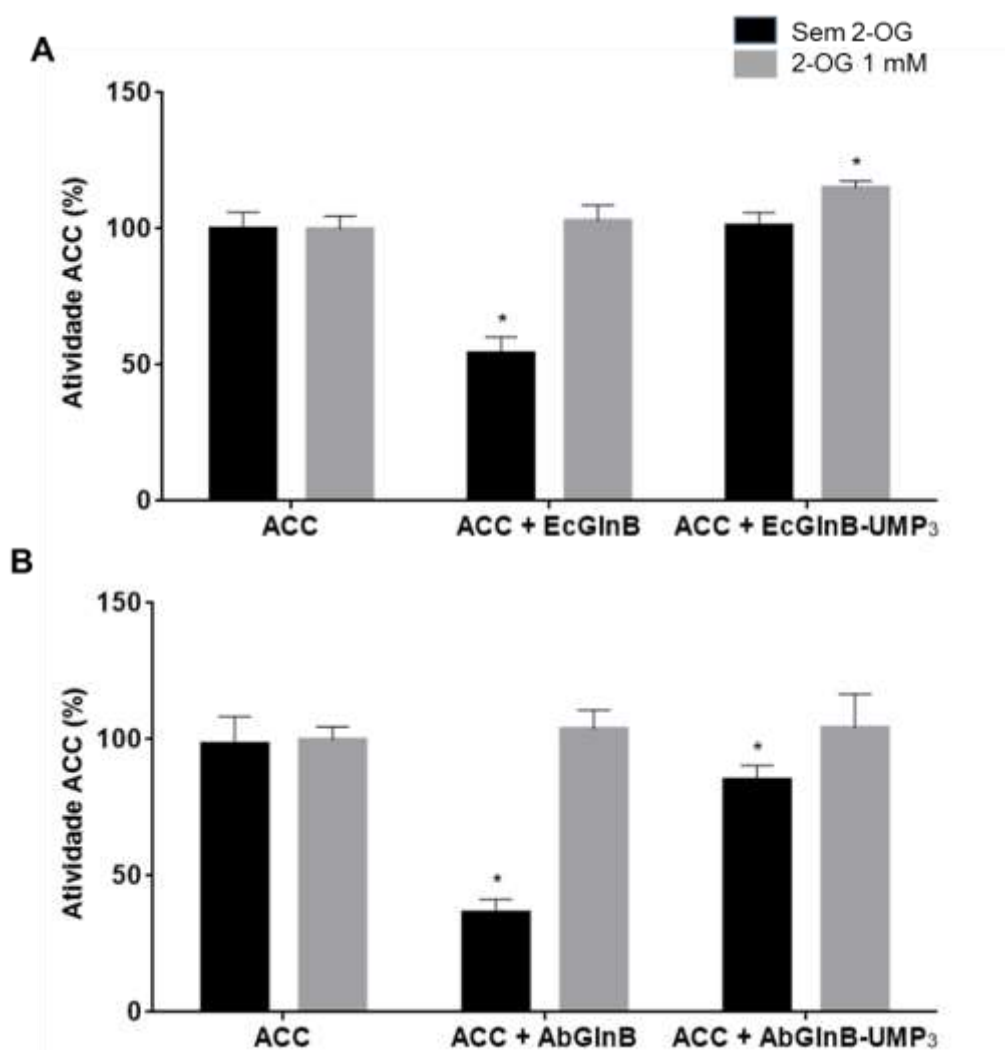


Figura 35 – Uridililação de GlnB afeta negativamente a interação com ACC. A atividade de ACC foi medida por ensaio enzimático acoplado na presença de 20 µg de EcGlnB (**A**) ou 12 µg AbGlnB (**B**) uridililada (UMP₃) ou não uridililada, na presença (barras cinza) ou ausência (barras pretas) de 1 mM de 2-OG. Os resultados são apresentados em % de atividade em relação à atividade de ACC sem GlnB. Os ensaios foram realizados em duplicata e o desvio padrão da média das amostras é indicado pela barra de erros. * indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (ACC) (teste t paramétrico não pareado – GraphPad Prism 6). Fonte: a autora.

Proteínas PII são uridililadas em resposta a baixos níveis de nitrogênio (Jiang *et al.*, 1998), que podem também ser sinalizados pelo aumento na concentração de 2-OG. Dessa forma, GlnB estará ligada a BCCP, inibindo a atividade de ACC apenas quando os níveis de carbono forem baixos e de nitrogênio, altos, sinalizados pela baixa concentração de 2-OG e ausência de uridililação.

5.9. Efeito de formas variantes de AbPII na atividade de EcACC

A ausência de inibição de ACC por GlnB uridililada e a reversão da inibição na presença de 2-OG reforçaram a hipótese da participação do *loop* T na formação do complexo ACC-PII. A fim de confirmar a importância da região do *loop* T para o efeito inibitório de AbGlnB sobre ACC, o efeito de AbGlnB e AbGlnZ com substituições na região diferencial do *loop* T entre essas duas proteínas (fig. 36A) foram testadas quanto à capacidade de inibir ACC por ensaio enzimático acoplado.

A deleção da região 42-54 (Δ *loop*) reverteu o efeito inibitório de GlnB sobre ACC, indicando que a região do *loop* T é fundamental para o efeito de GlnB (Fig. 36B). Em *A. brasilense*, GlnB e GlnZ apresentam 66% de identidade e 81% de similaridade, sendo que, na região do *loop* T, apenas 3 aminoácidos são diferenciais: 42, 52 e 54 (Fig. 36A). Substituições nas posições 42, 52 e 54 ou 52 e 54 de GlnZ não alteraram o efeito de GlnZ sobre ACC, ou seja, não foram capazes de inibir a atividade de ACC (assim como a proteína GlnZ nativa). GlnZ Q42H_S52V_S54D apresenta o *loop* T idêntico a AbGlnB e, ainda assim, não foi capaz de inibir ACC. Além disso, AbGlnB V52S_D54S inibiu ACC de forma similar à GlnB nativa. Esses dados indicam que, embora a região do *loop* seja essencial para o efeito de GlnB sobre ACC, ela não é a responsável pela especificidade de ligação de PII (GlnB mas não GlnK/GlnZ).

O mesmo efeito foi observado em ensaios de *pull down*, onde GlnB Δ *loop*, GlnZ S52V_S54D e GlnZ Q42H_S52V_S54D não co-precipitaram com AbGlnB, indicando que o complexo ACC-GlnB não foi formado (Thiago E. Rodrigues e Luciano F. Huergo, comunicação pessoal).

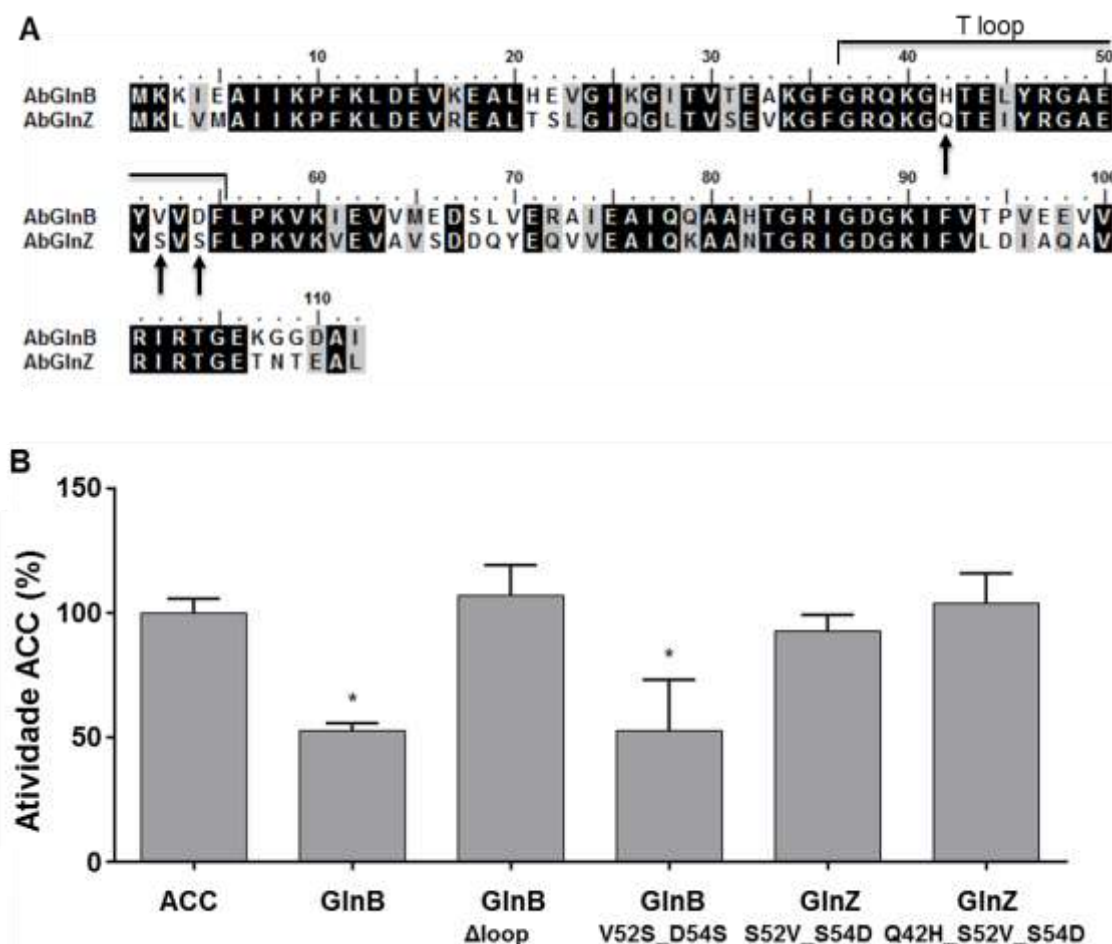


Figura 36 – Efeito de variantes de AbGlnB e AbGlnZ na atividade de ACC de *E. coli*. (A) Alinhamento de AbGlnB e AbGlnZ. Aminoácidos diferentes na região do *loop* T estão indicadas por setas. (B) A atividade de ACC foi medida por ensaio enzimático acoplado na presença ou ausência de 20 μ g de PII. O resultado é apresentado em % de atividade de ACC, sendo atividade de ACC sem PII considerada como 100%. Os ensaios foram realizados em triplicata. * indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (ACC) (teste T paramétrico não pareado – GraphPad Prism 6). As barras de erro indicam o desvio padrão da média das amostras. Fonte: a autora.

5.10. Efeito de variantes da proteína SeGlnB na inibição da atividade de EcACC

Os dados obtidos com 2-OG, GlnB-UMP e formas variantes de AbGlnB sugerem fortemente que a região do *loop* T de GlnB esteja envolvida na interação GlnB-ACC.

Visto que SeGlnB foi capaz de inibir o complexo ACC de forma mais eficiente que EcGlnB ou AbGlnB, diversas variantes da proteína GlnB de *S. elongatus* foram

avaliadas quanto à inibição da atividade de ACC (Fig. 37) para avaliar melhor o efeito de SeGlnB sobre EcACC, confirmar a participação do *loop* T e confirmar que o efeito de PII sobre ACC é conservado em todos os organismos que possuem proteína PII.

Foram testadas variantes na região do *loop* T (R45A, R47A, S49E, S49G, S49D, Y51A, T52A, e E54A), sendo que as variantes com alteração na posição 49 (Ser por Glu, Asp ou Gly) foram testados devido a esse ser o resíduo que sofre modificação em cianobactérias (fosforilação). SeGlnB T52A e E54A foram testados por serem os únicos resíduos que diferem entre GlnB e GlnK (ou GlnZ) na região do *loop* T. SeGlnB Y51A foi testada para verificar se a ausência de inibição quando GlnB está uridililada é devido à presença dos grupos UMP ou por que este resíduo (Y51) está envolvido diretamente na interação GlnB-ACC. SeGlnB E85A, I86N e R103H foram testadas por serem resíduos relacionados à ligação de efetores (FOKINA *et al.*, 2010; TRUAN *et al.*, 2010).

SeGlnB R45A e R47A inibiram ACC menos que SeGlnB WT ($p=0,0204$ e $0,0279$, respectivamente, inibição de ~30% R45A e R47A x 62% WT), sugerindo que essa região da proteína é importante para a formação do complexo ACC-GlnB. SeGlnB S49E e S49D mimetizam a fosforilação de GlnB de *S. elongatus*, e, assim como observado para GlnB-UMP, essa modificação parece interferir na formação do complexo, pois SeGlnB S49E inibiu apenas 34% da atividade de ACC, enquanto SeGlnB WT inibiu 62%. Mas não é possível afirmar se GlnB fosforilada pode inibir parcialmente ou se não teria efeito inibitório na atividade de ACC (de forma similar a GlnB-UMP), uma vez que não é possível obter SeGlnB completamente fosforilada *in vitro* por não se conhecer a enzima que catalisa a fosforilação de SeGlnB. Entretanto, é possível afirmar que a presença de cargas negativas nessa posição é o fator responsável pela menor inibição, uma vez que SeGlnB S49G inibiu ACC de forma semelhante a SeGlnB WT (fig. 37A). A alteração no resíduo 51 (Y51A) não alterou o efeito inibitório de SeGlnB sobre ACC, indicando que é a presença de grupos UMP o fator importante para que GlnB-UMP não iniba ACC.

A alteração nos resíduos 52 (T52A) e 54 (E54A) promoveu uma inibição de ACC ligeiramente maior que a inibição causada por SeGlnB (~70% x 62% WT), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Esses resíduos foram

testados a fim de se verificar se eram os responsáveis pela seletividade entre GlnB e GlnK na interação com ACC.

SeGlnB E85A inibiu ACC mais que SeGlnB WT ($p= 0,0487$; inibição 76% x 62%), mas SeGlnB I86N e R103H não foram capazes de inibir ACC. A troca do resíduo 86 (Ile para Asn) estabiliza a conformação de SeGlnB quando em complexo com NAGK (FOKINA *et al.*, 2010b; ZETH; FOKINA; FORCHHAMMER, 2012), porém faz com que o *loop* T fique mais rígido. A ausência de inibição de ACC por SeGlnB 86N pode indicar que, embora ATP deva estar presente para que a interação ocorra, é necessário que o *loop* permaneça flexível para que ocorra a formação do complexo.

Já o resíduo 103 (Arg) está diretamente relacionado à ligação de ATP a PII (FOKINA *et al.*, 2010). A troca de arginina por histidina faz com que a proteína sofra uma alteração na afinidade por ATP. A fim de verificar se SeGlnB 103H não inibiu ACC por não ligar ATP ou devido resíduo estar envolvido na formação do complexo, a ligação de ATP a SeGlnB 103H foi analisada por ITC (dados não mostrados) e os dados obtidos indicam que, embora essa proteína tenha menos afinidade a ATP que a proteína selvagem, nas condições utilizados nos ensaios enzimáticos (5 mM de ATP) ATP é saturante para SeGlnB 103H. Assim sendo, o resíduo 103 parece estar diretamente envolvido na formação do complexo ACC-GlnB.

Todas as proteínas variantes testadas acima foram ainda analisadas na presença de 1 mM de 2-OG (fig. 37B) e todas responderam de forma semelhante a SeGlnB WT, com reversão da inibição de ACC, indicando que em cianobactérias 2-OG causa o mesmo efeito que em *E. coli* e *A. brasilense*.

O efeito de diferentes concentrações de 2-OG foi testado, e foi verificado que o complexo SeGlnB-EcACC é muito mais sensível à concentração de 2-OG do que EcGlnB-EcACC ou AbGlnB-EcACC. Enquanto EcGlnB-EcACC e AbGlnB-EcACC apresentavam ~50% de inibição com 0,01 mM de 2-OG, precisando de 1 e 0,1 mM de 2-OG promover 100% da reversão da inibição de EcGlnB e AbGlnB, respectivamente, SeGlnB promoveu a remoção de 50% da inibição com menos de 0,005 mM de 2-OG (Fig. 38). O IC_{50} calculado para 2-OG foi 2,7 μ M.

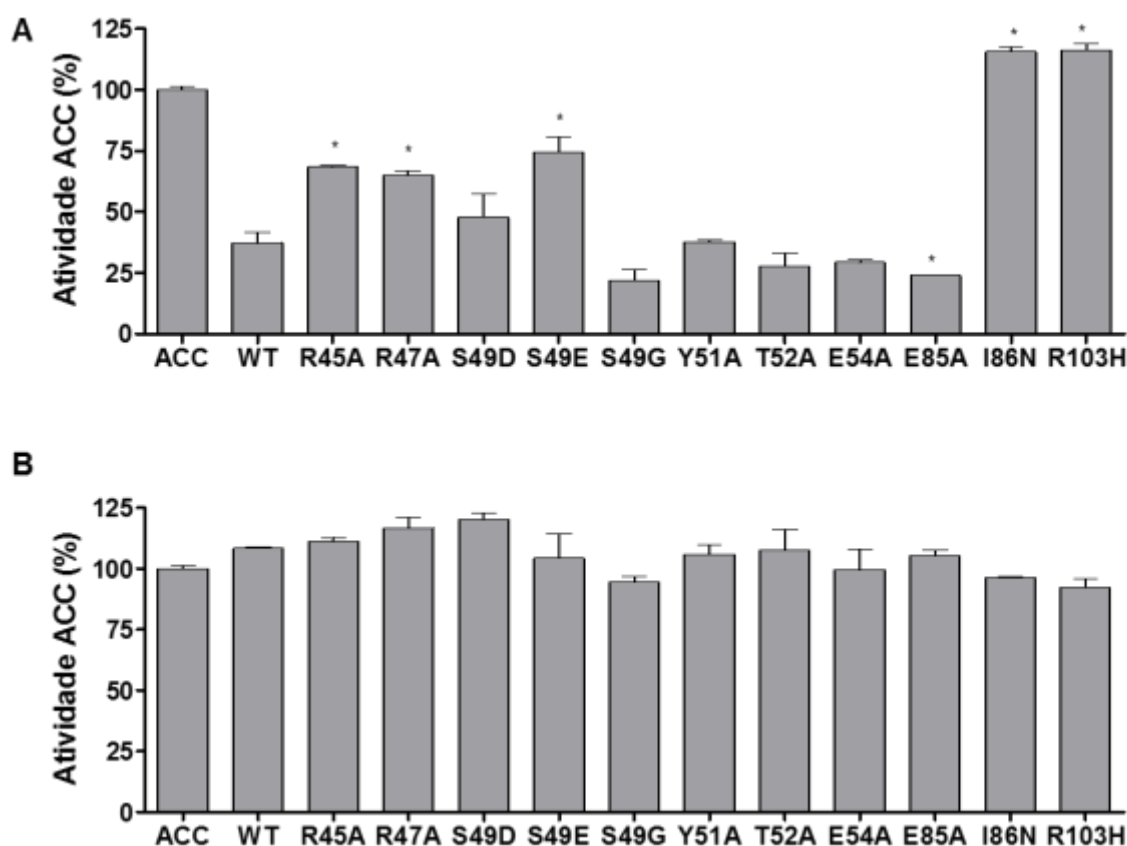


Figura 37 – Efeito de mutações pontuais em SeGlnB na interação com ACC. Diferentes proteínas GlnB variantes de *Synechococcus elongatus* foram avaliados por ensaio enzimático acoplado para avaliar o efeito na inibição de ACC na presença de ATP **(A)** ou ATP + 1 mM 2OG **(B)**. Foram usados 12 µg de cada SeGlnB e o percentual de atividade foi calculado em relação à atividade de ACC sem PII. WT – proteína selvagem. * indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a SeGlnB WT (teste t paramétrico não pareado – GraphPad Prism 6). As barras de erro indicam o desvio padrão da média das amostras. Fonte: a autora.

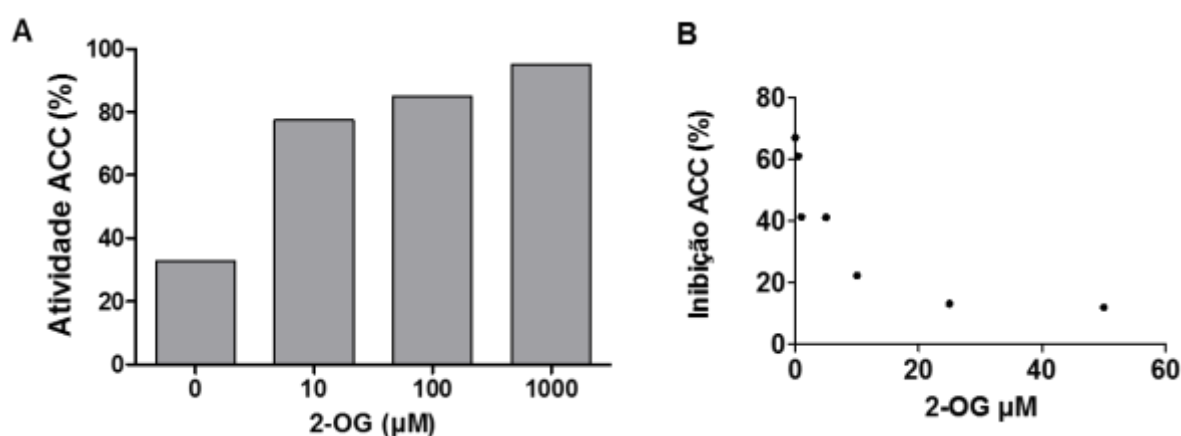


Figura 38 – Efeito de diferentes concentrações de 2-OG no efeito inibitório de SeGlnB sobre EcACC. A atividade de ACC foi medida por ensaio enzimático acoplado na presença de 12 µg de PII e ausência ou presença de 2-OG nas concentrações de 0,01, 0,1 ou 1mM **(A)** ou 0, 0,5, 1, 5, 10, 25 e 50 µM **(B)** de 2-OG. O resultado é apresentado em % de atividade de ACC, sendo atividade de ACC sem PII considerada como 100%. Fonte: a autora.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com Acetil-CoA carboxilase de *E. coli* (EcACC) revelaram que, nas condições testadas, essa proteína é inibida por GlnB mas não por GlnK ou GlnZ. A interação de BCCP foi inicialmente detectada com AbGlnZ nos ensaios de interação realizados com His-GlnZ e extrato de *A. brasilense* 2812 na presença de ATP. Ensaios realizados em nosso laboratório (Rodrigues, Thiago E.) revelaram que as formas His-tag de AbGlnB, EcGlnB, AbGlnZ e EcGlnK co-precipitam com EcBCCP na presença de ATP e que o complexo é desfeito na presença de ATP + 2-OG ou ADP (RODRIGUES *et al.*, 2014). Entretanto, não foi observada co-precipitação de GlnK e BCCP quando o sistema era formado por His-BC-BCCP e PII (Rodrigues, Thiago E.), da mesma forma que não foi observada inibição do complexo na presença de GlnK e GlnZ (Fig. 31). Esse dado sugere que a ligação de BCCP à BC impede a ligação de GlnK (ou GlnZ).

Proteínas GlnB de diferentes organismos foram capazes de inibir EcACC. Esse resultado sugere que esse seja um mecanismo de regulação de ACC conservado em bactérias e cloroplastos de plantas (uma vez que a interação PII-BCCP já foi identificada em *A. thaliana*). Essa hipótese é baseada no fato de GlnB de γ -proteobactéria (*E. coli*), α -proteobactéria (*A. brasilense*) e cianobactéria (*S. elongatus*) apresentarem efeito inibitório sobre EcACC.

Análises de identidade/similaridade das proteínas BCCP indicaram que EcBCCP e AbBCCP tem 43% de identidade e 58% de similaridade, enquanto EcBCCP e SeBCCP tem 53% de identidade e 81% de similaridade, com maior conservação na região C-terminal (Fig. 7). Embora a região de interação de BCCP-GlnB não seja conhecida, sabemos que a interação é dependente da biotinylation de BCCP, pois o complexo PII-BCCP só ocorre quando BCCP está biotinilada (RODRIGUES *et al.*, 2014) e, esse dado justifica a ausência de interação entre GlnZ e AbBCCP, pois AbBCCP não foi biotinilada de forma eficiente *in vitro*.

As tentativas de biotinylation de AbBCCP (His e nativa) foram realizadas com EcBirA, pela disponibilidade dessa enzima e também pela sua utilização para biotinylation de BCCP em sistemas heterólogos, como, por exemplo, para biotinilar a subunidade α de MtACC (GAGO *et al.*, 2006). Entretanto, EcBCCP e Mt α -ACC

possuem a lisina (122 em *E. coli*) flanqueada por resíduos de metionina, enquanto AbBCCP possui uma metionina anterior e uma valina posterior, e talvez essa valina interfira no reconhecimento por EcBirA. De qualquer modo, mais ensaios com AbBCCP e EcBirA precisam ser realizados na tentativa de otimizar o sistema. Outro ponto importante é que em *E. coli*, BirA tem apenas um substrato, que é a proteína BCCP, a única proteína biotinilada nesse organismo (CHAPMAN-SMITH; CRONAN, 1999). Já *A. brasilense* apresenta pelo menos 5 proteínas biotiniladas (identificadas nos ensaios de interação). Análises iniciais por *BLAST* indicam apenas uma proteína BirA no genoma de *A. brasilense* sp245, com 33% de identidade e 48% de similaridade com EcBirA. Mais análises são necessárias para saber se essa proteína é a única responsável pela biotinylação de todas as proteínas com domínio biotinil em *A. brasilense*.

De todo modo, o complexo EcBCCP-PII foi eficientemente detectado *in vitro*. A inibição do complexo ACC por GlnB se mostrou dose dependente da concentração de GlnB, sendo que AbGlnB e SeGlnB causaram uma inibição máxima de EcACC maior do que EcGlnB (90, 93 e 49% respectivamente, com EC₅₀ de 0,43, 0,31 e 0,81, respectivamente). Isso sugere que em *E. coli* a inibição de ACC é apenas parcial (~50%). O papel primário de ácidos graxos bacterianos é a biossíntese de membranas e, em alguns organismos, como *E. coli*, essa é a única função de ácidos graxos. Entretanto, vários outros organismos utilizam ácidos graxos para outras vias, como discutido anteriormente, para *S. coelicolor* e *M. tuberculosis*, ácidos graxos são usados para síntese de policetídeos e, para *M. tuberculosis*, produção de ácido micólico (HOPWOOD; SHERMAN, 1990; DANIEL *et al.*, 2007; RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Em várias bactérias, são encontrados componentes de reserva lipídica, principalmente na forma de polihidroxialcanoatos, enquanto que actinomicetos como *Streptomyces*, *Mycobacterium* e *Rhodococcus* acumulam triacilgliceróis (geralmente contendo cadeias unusuais de acil) (CRONAN; THOMAS, 2009).

É interessante que em *E. coli* os lipídeos sejam sintetizados e utilizados apenas para síntese de membranas enquanto em *A. brasilense* e *S. elongatus* o metabolismo lipídico está também associado a síntese de polihidroxibutirato (PHB) (MIYAKE *et al.*, 1997, 2000; KADOURI; JURKEVITCH; OKON, 2003; MÜLLER-SANTOS *et al.*, 2015). É possível que o efeito mais acentuado na inibição de EcACC

por AbGlnB e SeGlnB seja devido a, nesses organismos, o metabolismo de lipídeos ser mais complexo do que em *E. coli*, requerendo assim um ajuste mais fino.

Proteínas PII exercem suas funções metabólicas em resposta a efetores, uma vez que a ligação de ADP, ATP e 2-OG a PII faz com que sua estrutura sofra alterações conformacionais que são favoráveis ou desfavoráveis à interação de PII com proteínas alvo. Em *A. brasilense*, GlnB pode se ligar a DraT, AmtB e NifA, enquanto GlnZ pode ligar DraG e AmtB. As interações com DraG, DraT e AmtB ocorrem na presença de ADP, e os complexos são desfeitos na presença de ATP ou ATP+2-OG, sendo a concentração de 2-OG o fator determinante para preferência de ligação de ADP ou ATP por PII (GERHARDT *et al.*, 2012). Já a interação NifA-GlnB ocorre preferencialmente na presença de GlnB-UMP (que é a forma que ativa NifA), que se liga ao domínio GAF de NifA. Nessa condição, GlnB estará ligada a ATP e 2-OG (CHEN *et al.*, 2005). Esses são apenas alguns dados que provam a importância dos efetores para o efeito de PII.

Desse modo, Rodrigues e colaboradores (2014) verificaram o efeito dos efetores ATP, ADP e 2-OG na formação do complexo PII-BCCP e PII-BCCP-BC por co-precipitação. Os dados mostraram que a formação do complexo ocorre exclusivamente na presença de ATP, e que 2-OG tem um efeito negativo sobre a formação do complexo, que é dose dependente da concentração de 2-OG. Os dados obtidos nos ensaios de atividade de ACC (Fig. 33 e 38) estão de acordo com os dados de co-precipitação, e indicam que altas concentrações de 2-OG (1 mM) removem quase completamente o efeito inibitório de EcGlnB, AbGlnB e SeGlnB.

Entretanto, é curioso que as proteínas GlnB tenham apresentado sensibilidades diferentes ao efeito de 2-OG. SeGlnB foi a mais sensível às baixas concentrações de 2-OG. A adição de 1 μ M de 2-OG diminuiu a inibição de ACC de 67% para 41%, e 10 μ M de 2-OG diminuiu a inibição para 22% (uma diminuição de 67% da inibição máxima), enquanto na mesma concentração de 2-OG, a inibição de AbGlnB sobre ACC foi diminuída em 52% (de 60% para 20% de inibição) e de EcGlnB em apenas 36% (de 42% para 27% de inibição). Porém, AbGlnB perdeu todo o efeito inibitório sobre ACC na concentração de 100 μ M de 2-OG (talvez menos, mas concentrações inferiores não foram testadas), enquanto SeGlnB e EcGlnB apresentaram uma inibição residual até 1 mM de 2-OG (maior concentração

testada). A 100 μ M de 2-OG SeGlnB reverteu 77% da inibição inicial de ACC, contra apenas 50 da reversão da inibição por EcGlnB.

O fato do complexo EcACC-SeGlnB ser mais sensível a concentrações menores de 2-OG pode estar relacionado ao fato de *S. elongatus* ser um organismo fotoautotrófico. Além disso, cianobactérias apresentam um ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) atípico, devido à ausência da enzima 2-oxoglutarato desidrogenase (OGDH), fazendo necessárias etapas adicionais para a produção de 2-OG e succinato, com acoplamento de vias como a do glioxilato e enzimas extras como 2-OG descarboxilase (OGDC) e semialdeído succínico desidrogenase (SSADH) (ZHANG; BRYANT, 2011; STEINHAUSER; FERNIE; ARAÚJO, 2012). Nesse contexto, PII é fortemente considerada como um regulador do TCA incompleto (STEINHAUSER; FERNIE; ARAÚJO, 2012), o que poderia justificar sua maior sensibilidade às flutuações dos níveis de 2-OG (quando comparada a EcGlnB ou AbGlnB).

Além do efeito de 2-OG no complexo GlnB-ACC, foi verificado o efeito da uridililação de GlnB (para AbGlnB e EcGlnB) que, assim como 2-OG, evita o efeito inibitório de GlnB sobre ACC. Dados equivalentes foram obtidos em ensaios de co-precipitação, não tendo sido detectada interação ACC-GlnB na presença de GlnB-UMP (tanto AbGlnB quanto EcGlnB). Essa ausência de efeito inibitório pode ter duas explicações: a primeira é que GlnB-UMP está ligada a 2-OG e ATP, desse modo, podendo ter o mesmo efeito já descrito para 2-OG. A segunda, e mais plausível, é que a presença do grupamento UMP no *loop T* interfira na formação do complexo, e que o *loop T* possa estar diretamente envolvido na interação GlnB-BCCP, o que também justificaria o efeito dissociativo de 2-OG (que causa alteração conformacional na região do *loop T*).

A fim de verificar se esse efeito também existia para SeGlnB, foram testadas três proteínas variantes no resíduo 49, que em cianobactéria é o resíduo fosforilado (equivalente à Tyr51 na uridililação). Como a proteína responsável pela fosforilação de GlnB em cianobactérias não é conhecida, é necessária a utilização de mutantes que mimetizem essa modificação. Foram testadas as variantes S49E, S49G e S49D. 49G e D possuem carga negativa, sendo que 49E seria a variante mais similar à GlnB fosforilada, devido ao tamanho da cadeia lateral do glutamato. Os resultados obtidos sugerem que a adição de carga negativa nessa posição tem efeito na

formação do complexo GlnB-ACC, pois GlnB S49E inibiu apenas 25% da atividade de ACC, enquanto SeGlnB nativa (wt) inibiu 57%. SeGlnB S49D inibiu 52%, inibição apenas ligeiramente menor que SeGlnB wt. O interessante é que SeGlnB S49G inibiu 78% da atividade de EcACC, valor muito superior à inibição causada por SeGlnB wt. Esses dados sugerem que esse aminoácido é importante para a formação do complexo GlnB-ACC, e que a presença de uma cadeia lateral menor nessa posição (glicina substituindo serina) favorece a formação do complexo.

Para confirmar a hipótese da participação do *loop* T na formação do complexo, foram testadas proteínas variantes de *A. brasilense* e *S. elongatus*. Os dados obtidos indicam que a região do *loop* T de AbGlnB é essencial à formação do complexo, uma vez que a proteína AbGlnB com deleção do *loop* perdeu a capacidade de inibir ACC (Fig. 36), bem como a capacidade de interagir com BCCP (Rodrigues, T. E). A diferença entre as proteínas PII de *A. brasilense* é de 38 aminoácidos, sendo que desses 38, 16 são similares. Na região do *loop* T apenas 4 aminoácidos são diferentes entre GlnB e GlnZ, sendo um deles L/I, o que resulta em 3 aminoácidos diferentes de fato: 42, 52 e 54. Visto que GlnB é capaz de ligar BCCP e regular a atividade de ACC, enquanto GlnZ liga BCCP mas não tem efeito sobre ACC e que a região do *loop* T parece essencial para o efeito inibitório de GlnB, é plausível pensar que os aminoácidos do *loop* T que diferem entre GlnB e GlnZ seriam os que determinam a especificidade da interação com ACC.

Entretanto, embora o *loop* T seja essencial, ele não parece ser quem determina a especificidade, pois a proteína variante GlnZ Q42H_S52V_S54D (que possui *loop* T idêntico a GlnB) não foi capaz de inibir ACC, sugerindo que, apesar do requerimento do *loop* T para a formação do complexo, alguma outra região da proteína está envolvida na interação e é quem determina a especificidade entre GlnB e GlnZ/K. Mutações nas posições 52 e 54 de SeGlnB aumentaram ligeiramente o efeito inibitório de SeGlnB, mas reforçam a teoria de que esses não são os aminoácidos determinantes para a interação GlnB-BCCP. Ainda na região do *loop* T, foram testadas as proteínas variantes 45A, 47A e 51A. SeGlnB 51A apresentou atividade igual a SeGlnB nativa, enquanto SeGlnB 45A e 47A apresentaram uma diminuição no efeito inibitório (~50% a menos que wt), sugerindo alguma participação desses resíduos no efeito de GlnB.

Entretanto, as alterações de aminoácidos mais significantes foram nas posições 86 e 103, pois a alteração desses aminoácidos removeu completamente o efeito inibitório de SeGlnB. Como descrito anteriormente, Ile86 (Ile para Asn) está relacionada à estabilização da conformação de SeGlnB ligada à NAGK (Fig. 39), e esta estrutura apresenta um empacotamento do *loop* T causado por uma ponte de hidrogênio adicional entre Asn86-Thr43. Essa ponte extra leva à formação de outra ponte de hidrogênio entre Lys58-Glu44, que está relacionada à estabilização da conformação de PII ligada a ATP (FOKINA *et al.*, 2010b). Desse modo, embora o *loop* esteja “similar” à conformação com ATP, ele apresenta um empacotamento desfavorável à formação do complexo GlnB-ACC, sugerindo que é necessário que o *loop* permaneça flexível para que ocorra a formação do complexo.

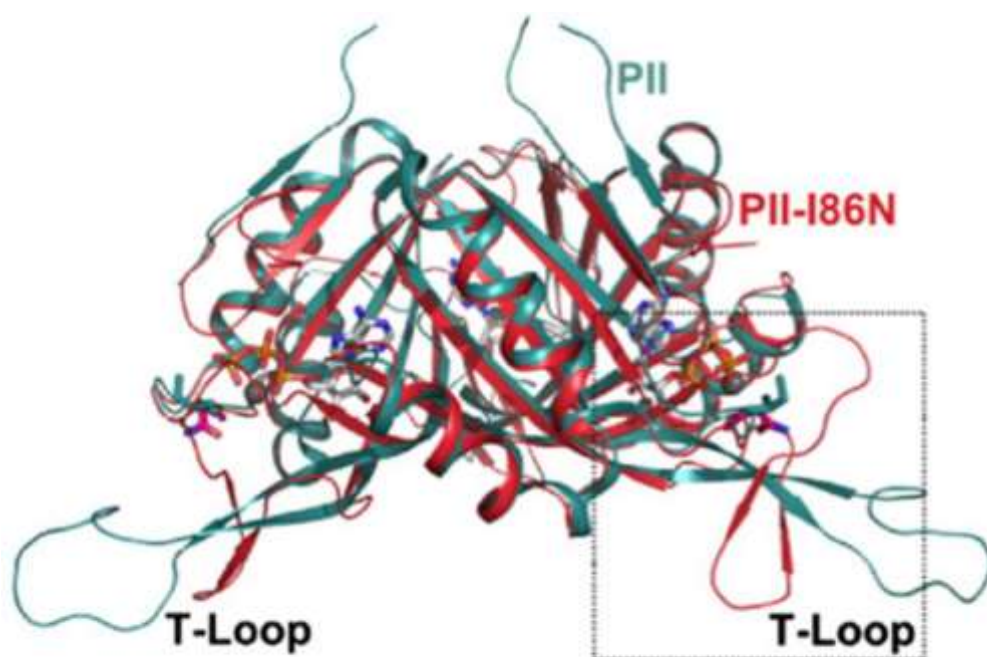


Figura 39 – Comparação da estrutura de SeGlnB e SeGlnB I86N. Estruturas cristalográficas obtidas na presença de ATP. Estrutura em verde: GlnB nativa; vermelho: GlnB I86N. Fonte: (FOKINA *et al.*, 2010b)

Já o resíduo 103 (Arg) está diretamente relacionado à ligação de ATP a PII (FOKINA *et al.*, 2010a, 2010b). A ligação de ATP envolve K90 e R38 do monômero A; R101 e R103 do monômero B, e um pequeno número de pontes de hidrogênio (FOKINA *et al.*, 2010a). A troca de arginina por histidina leva a uma alteração na afinidade por ATP que, entretanto, não é o fator que impediu a formação do

complexo, pois nas condições testadas, ATP era saturante mesmo para a menor afinidade de SeGlnB R103A. A ausência de inibição pode então sugerir que esse resíduo esteja diretamente relacionado à formação do complexo GlnB-ACC. Esse resíduo R103 é altamente conservado em proteínas PII.

Os dados obtidos com as proteínas mutantes de SeGlnB reforçam a importância do efector ATP para a formação do complexo e sugerem que a região de ligação de ATP pode ser importante diretamente na formação do complexo PII-ACC.

Vale ressaltar que além da presença de ATP ligado a PII, a biotilação de BCCP é um fator determinante para a formação do complexo. O grupo biotínil ligado a BCCP atua como um braço móvel, se movendo entre os sítios ativos de BC e CT. É possível que a ligação de GlnB ocorra nessa região e interfira na mobilidade desse “braço”, interferindo assim na atividade de ACC. Essa hipótese está de acordo com os dados cinéticos obtidos para os complexos EcACC-EcGlnB e EcACC-AbGlnB, onde a presença de GlnB altera a velocidade máxima da enzima e sua taxa de renovação (*turnover*) porém sem alteração na constante de afinidade (K_M) pelo substrato Acetil-CoA, indicando não se tratar de uma inibição competitiva.

Os dados obtidos sugerem que GlnB seja um regulador de ACC e que essa função seja conservada em todos os organismos que possuem PII, uma vez que organismos de diferentes grupos apresentem essa função (cloroplasto de plantas, α -proteobacteria, γ -proteobacteria, cianobactéria e actinobacteria). Os dados obtidos são provenientes apenas de ensaios realizados *in vitro*, fazendo necessária a confirmação dessa função *in vivo*. Entretanto, os dados são consistentes, sugerindo que essa é função real de PII.

Desse modo, a via de biossíntese de ácidos graxos em bactérias é regulada pelos mecanismos já conhecidos (Acil-ACP, regulação transcricional, entre outros menos conhecidos), mas é também regulada pelo balanço C/N celular, sinalizado via GlnB. Com base nos dados obtidos, é possível o estabelecimento de um modelo (Fig. 40), onde GlnB regularia a atividade de ACC sob condições de limitação de carbono e abundância de nitrogênio (condições equivalentes a baixos níveis de 2-OG). A diminuição na concentração de nitrogênio e o aumento na concentração de carbono causam um aumento na concentração intracelular de 2-OG, promovendo assim a dissociação do complexo GlnB-ACC. Além disso, quando as concentrações

de carbono e nitrogênio estão altas, PII se encontra uridililada e, desse modo, também não inibiria ACC.

É interessante destacar que é bem relatada na literatura a correlação entre acúmulo de triacilgliceróis (TAG) e depleção de nitrogênio no meio. Grande parte dos estudos foram realizados com microalgas, com destaque para as microalgas *Chlorella sp.*, *Nannocloropsis sp.* e *Haematococcus pluvialis* (ZHEKISHEVA *et al.*, 2002; BREUER *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2014). Martin e colaboradores (2014) verificaram que, em *Chlorella sp.* e *Nannocloropsis sp.*, a escassez de nitrogênio altera não só a quantidade de TAG como o balanço global de lipídios, com aumento principalmente de TAG e de fosfatidilglicerol. O acúmulo de TAG em resposta a ausência de nitrogênio também é bem conhecido para actinomicetos, como *Rhodococcus*, *Gordonia sp.* e *Streptomyces* (OLUKOSHI; PACKTER, 1994; EBERLY; RINGELBERG; INDEST, 2012; AMOROSO; BENIMELI; CUOZZO, 2013). *Gordonia sp.* KTR9, que é um organismo de interesse para produção de biodiesel por apresentar tolerância de até 4% de metanol e etanol, apresentou um aumento de 75% na quantidade de ácidos graxos e 50% na quantidade de TAG quando cultivada em condição de limitação de nitrogênio (EBERLY; RINGELBERG; INDEST, 2012).

Recentemente, Zalutskaya e colaboradores (2015) verificaram que, na alga verde *Chlamydomonas*, o silenciamento da expressão de PII leva a um aumento na produção e acúmulo de triacilgliceróis na forma de corpos lipídicos (*lipid body*). Os autores verificaram um aumento de aproximadamente 1,5 vezes no tamanho e número de corpos lipídicos nas cepas deficientes em PII em relação às cepas controle.

É possível que, em parte, o acúmulo de TAG ocorra em resposta à uridililação de PII, que em baixo nitrogênio é uridililada por GlnD (Fig. 40), não podendo assim interagir com ACC, que se torna completamente ativa, o que leva a um aumento na produção de ácidos graxos.

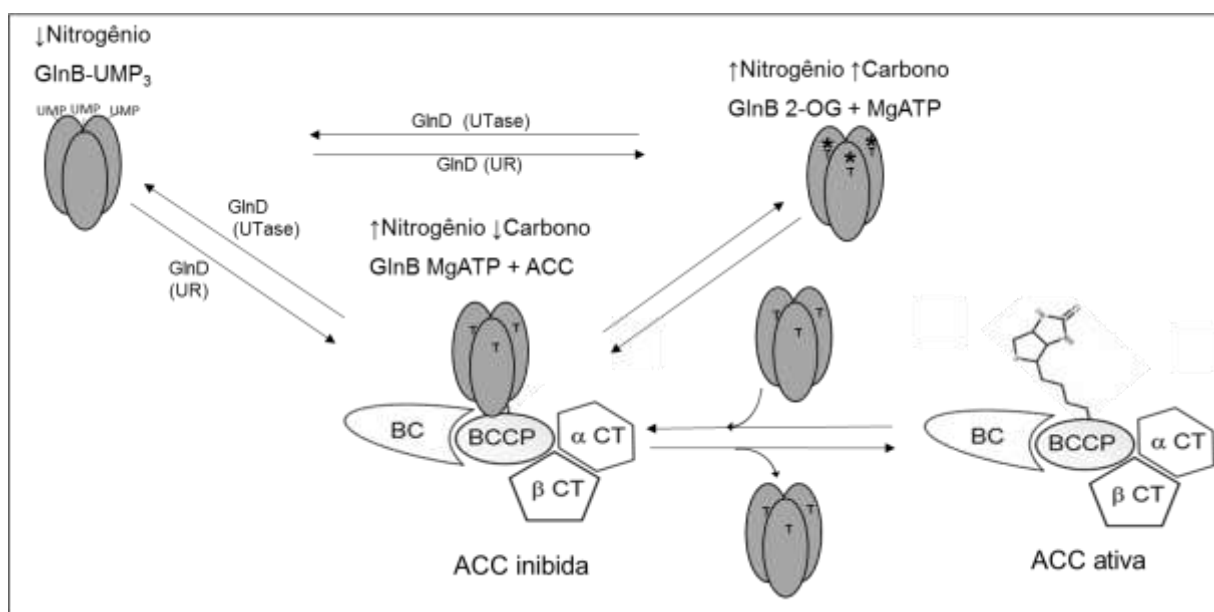


Figura 40 – Modelo da Regulação de ACC por GlnB. Em baixo nitrogênio, altos níveis de 2-OG e ATP levam à uridililação de PII por GlnD (UTase). Em altos níveis de carbono e nitrogênio, GlnD está com a função removedora de uridilil (UR) ativada, e, desse modo, PII está desuridililada. Uma vez que a quantidade de carbono diminua e/ou nitrogênio aumente, ocorrerá uma diminuição nos níveis de 2-OG e, assim, PII ligada a ATP (sem 2-OG) pode interagir com ACC, inibindo-a. * - 2-OG; T – MgATP; UMP - uridililação. Fonte: a autora.

O conhecimento de GlnB como regulador de ACC abre novas possibilidades para a engenharia metabólica, para a produção de lipídeos e produtos derivados. Entretanto, o principal conhecimento gerado a partir dos dados obtidos é o de que proteínas PII bacterianas apresentam outras funções além das relacionadas ao metabolismo de nitrogênio, sugerindo que essa proteína possa ser um regulador global do metabolismo bacteriano, integrando sinais de disponibilidade de nutrientes e balanço energético. Essa foi a primeira proteína do metabolismo de carbono descrita como alvo de PII. Em bactérias, entretanto, com a validação dos dados obtidos através dos ensaios de interação, é possível que mais proteínas relacionadas ao metabolismo, que não de nitrogênio, venham a ser descritas e caracterizadas.

É interessante destacar ainda que os dados obtidos indicam uma regulação cruzada entre proteínas GlnB de *A. brasilense* e *S. elongatus* com ACC de *E. coli*, além do efeito de EcGlnB sobre EcACC. Esses dados, juntamente com os dados obtidos para *A. thaliana* (FERIA BOURRELLIER *et al.*, 2010) e o efeito de PII observado no metabolismo de lipídios de *Chlamydomonas* (ZALUTSKAYA *et al.*, 2015), indicam que, além de conservada, essa deve ser uma função ancestral,

anterior ao evento de endossimbiose que deu origem aos cloroplastos de plantas. Se assim for, é possível que plantas em geral apresentem essa característica, corroborando com a proposta de Zalutskaya e colaboradores (2015) de que o acúmulo de TAG em cepas sem expressão de PII se dá por ausência de repressão de ACC por PII.

7. CONCLUSÕES

- ✓ 125 proteínas foram identificadas como possíveis alvos de PII em *A. brasilense*;
- ✓ AbPII pode estar envolvida com a regulação de diversos processos metabólicos, como resposta estrigente, metabolismo de poliaminas, biossíntese de cofatores e metabolismo de RNA;
- ✓ Proteínas GlnB de diferentes bactérias são capazes de regular a atividade de EcACC, indicando que essa é uma função conservada de PII;
- ✓ A regulação de ACC por GlnB responde de forma dose-dependente à concentração de 2-OG;
- ✓ Modificação pós traducional de GlnB remove o efeito inibitório de GlnB sobre ACC (Ec e AbGlnB-UMP e SeGlnB S49E);
- ✓ O efeito de GlnB na atividade de ACC se dá por diminuição da taxa de renovação de ACC, mas sem alterar a sua afinidade ao substrato acetil-CoA;
- ✓ A região do *loop* T está envolvida na formação do complexo GlnB-ACC, mas não é a região que define a especificidade de ligação entre GlnB e GlnK (GlnZ);
- ✓ O efeito de GlnB sobre ACC, provavelmente, responde à variação intracelular de carbono e nitrogênio;
- ✓ Proteínas PII têm função regulatória no metabolismo de ácidos graxos, confirmando que sua função vai além do metabolismo de nitrogênio.

8. REFERÊNCIAS

- ABU-ELHEIGA, L.; BRINKLEY, W. R.; ZHONG, L.; CHIRALA, S. S.; WOLDEGIORGIS, G.; WAKIL, S. J. The Subcellular Localization of Acetyl-CoA Carboxylase 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 4, p. 1444–1449, 2000.
- AMOROSO, M. J.; BENIMELI, C. S.; CUOZZO, S. A. Actinobacteria: application in bioremediation and production of industrial enzymes. [s.l.] CRC Press, 2013.
- ANDERSEN, J. T.; JENSEN, K. F.; POULSEN, P. Role of Transcription Pausing in the Control of the *pyrE* Attenuator in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 327–333, 1991.
- ARAÚJO, L. M. Purificação e caracterização da proteína GlnB de *Azospirillum brasilense*. Curitiba, 2003. 100 f. Dissertação (mestrado em Bioquímica). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- ARAÚJO, L. M.; HUERGO, L. F.; INVITTI, A. L.; GIMENES, C. I.; BONATTO, A. C.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Different Responses of the GlnB and GlnZ Proteins upon in Vitro Uridylylation by the *Azospirillum brasilense* GlnD Protein. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 289–294, 2008.
- ARAUJO, M. S.; BAURA, V. A.; SOUZA, E. M.; BENELLI, E. M.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. In Vitro Uridylylation of the *Azospirillum brasilense* N-Signal Transducing GlnZ Protein. **Protein Expression and Purification**, v. 33, n. 1, p. 19–24, 2004.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII Signal Transduction Proteins, Pivotal Players in Microbial Nitrogen Control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 80–105, 2001.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 16, p. 4830–4838, 1996.
- ATHAPPILLY, F. K.; HENDRICKSON, W. A. Structure of the Biotinyl Domain of Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Determined by MAD Phasing. **Structure (London, England: 1993)**, v. 3, n. 12, p. 1407–1419, 1995.
- ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Role of the GlnK Signal Transduction Protein in the Regulation of Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 431–447, 1998.
- ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Characterization of the GlnK Protein of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 301–313, 1999.
- BANDYOPADHYAY, A.; ARORA, A.; JAIN, S.; LASKAR, A.; MANDAL, C.; IVANISENKO, V. A.; FOMIN, E. S.; PINTUS, S. S.; KOLCHANOV, N. A.; MAITI, S.; RAMACHANDRAN, S. Expression and Molecular Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* PII Protein. **Journal of Biochemistry**, v. 147, n. 2, p. 279–289, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-Plant Relationships: Physiological, Molecular, Agricultural, and Environmental Advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521–577, 2004.

BAUD, S.; FERIA BOURRELLIER, A. B.; AZZOPARDI, M.; BERGER, A.; DECHORGNAT, J.; DANIEL-VEDELE, F.; LEPINIEC, L.; MIQUEL, M.; ROCHAT, C.; HODGES, M.; FERRARIO-MÉRY, S. PII Is Induced by WRINKLED1 and Fine-Tunes Fatty Acid Composition in Seeds of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 64, n. 2, p. 291–303, 2010.

BAZET LYONNET, B.; DIACOVICH, L.; CABRUJA, M.; BARDOU, F.; QUÉMARD, A.; GAGO, G.; GRAMAJO, H. Pleiotropic Effect of AccD5 and AccE5 Depletion in Acyl-Coenzyme A Carboxylase Activity and in Lipid Biosynthesis in *Mycobacteria*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

BECKETT, D.; KOVALEVA, E.; SCHATZ, P. J. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. **Protein Science: A Publication of the Protein Society**, v. 8, n. 4, p. 921–929, 1999.

BEEZ, S.; FOKINA, O.; HERRMANN, C.; FORCHHAMMER, K. N-Acetyl-L-Glutamate Kinase (NAGK) from Oxygenic Phototrophs: PII Signal Transduction across Domains of Life Reveals Novel Insights in NAGK Control. **Journal of Molecular Biology**, v. 389, n. 4, p. 748–758, 2009.

BENSON, B. K.; MEADES, G.; GROVE, A.; WALDROP, G. L. DNA inhibits catalysis by the carboxyltransferase subunit of acetyl-CoA carboxylase: Implications for active site communication. **Protein Science**, v. 17, n. 1, p. 34–42, 2008.

BILDER, P.; LIGHTLE, S.; BAINBRIDGE, G.; OHREN, J.; FINZEL, B.; SUN, F.; HOLLEY, S.; AL-KASSIM, L.; SPESSARD, C.; MELNICK, M.; NEWCOMER, M.; WALDROP, G. L. The Structure of the Carboxyltransferase Component of Acetyl-CoA Carboxylase Reveals a Zinc-Binding Motif Unique to the Bacterial Enzyme. **Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1712–1722, 2006.

BLANCHARD, C. Z.; CHAPMAN-SMITH, A.; WALLACE, J. C.; WALDROP, G. L. The Biotin Domain Peptide from the Biotin Carboxyl Carrier Protein of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase Causes a Marked Increase in the Catalytic Efficiency of Biotin Carboxylase and Carboxyltransferase Relative to Free Biotin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 45, p. 31767–31769, 1999.

BOLOGNA, F. P.; ANDREO, C. S.; DRINCOVICH, M. F. *Escherichia coli* Malic Enzymes: Two Isoforms with Substantial Differences in Kinetic Properties, Metabolic Regulation, and Structure. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 16, p. 5937–5946, 2007.

BONATTO, A. C.; COUTO, G. H.; SOUZA, E. M.; ARAÚJO, L. M.; PEDROSA, F. O.; NOINDORF, L.; BENELLI, E. M. Purification and Characterization of the Bifunctional Uridylyltransferase and the Signal Transducing Proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 55, n. 2, p. 293–299, 2007.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BREUER, G.; LAMERS, P. P.; MARTENS, D. E.; DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H. The Impact of Nitrogen Starvation on the Dynamics of Triacylglycerol Accumulation in Nine Microalgae Strains. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 217–226, 2012.

BROUSSARD, T. C.; KOBE, M. J.; PAKHOMOVA, S.; NEAU, D. B.; PRICE, A. E.; CHAMPION, T. S.; WALDROP, G. L. The Three-Dimensional Structure of the Biotin Carboxylase-Biotin Carboxyl Carrier Protein Complex of *E. coli* Acetyl-CoA Carboxylase. **Structure (London, England : 1993)**, v. 21, n. 4, p. 650–657, 2013a.

BROUSSARD, T. C.; PRICE, A. E.; LABORDE, S. M.; WALDROP, G. L. Complex Formation and Regulation of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase. **Biochemistry**, v. 52, n. 19, p. 3346–3357, 1 2013b.

BROWN, D. R.; BARTON, G.; PAN, Z.; BUCK, M.; WIGNESHWERARAJ, S. Nitrogen Stress Response and Stringent Response Are Coupled in *Escherichia coli*. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

BUENO, R.; PAHEL, G.; MAGASANIK, B. Role of *glnB* and *glnD* gene products in regulation of the *glnALG* operon of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 164, n. 2, p. 816–822, 1985.

BURILLO, S.; LUQUE, I.; FUENTES, I.; CONTRERAS, A. Interactions between the Nitrogen Signal Transduction Protein PII and N-Acetyl Glutamate Kinase in Organisms That Perform Oxygenic Photosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 11, p. 3346–3354, 2004.

BURMANN, B. M.; RÖSCH, P. The role of *E. coli* Nus-factors in transcription regulation and transcription:translation coupling. **Transcription**, v. 2, n. 3, p. 130–134, 2011.

CARDINALE, C. J.; WASHBURN, R. S.; TADIGOTLA, V. R.; BROWN, L. M.; GOTTESMAN, M. E.; NUDLER, E. Termination Factor Rho and Its Cofactors NusA and NusG Silence Foreign DNA in *E. coli*. **Science**, v. 320, n. 5878, p. 935–938, 2008.

CARNEIRO, S.; LOURENÇO, A.; FERREIRA, E. C.; ROCHA, I. Stringent Response of *Escherichia coli*: Revisiting the Bibliome Using Literature Mining. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 1, n. 1, p. 14, 2011.

CASTELLEN, P.; REGO, F. G. M.; PORTUGAL, M. E. G.; BENELLI, E. M. The *Streptococcus* Mutans GlnR Protein Exhibits an Increased Affinity for the *glnRA* Operon Promoter When Bound to GlnK. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 12, p. 1202–1208, 2011.

CHAPMAN-SMITH, A.; CRONAN, J. E. The Enzymatic Biotinylation of Proteins: A Post-Translational Modification of Exceptional Specificity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 24, n. 9, p. 359–363, 1999.

CHAPMAN-SMITH, A.; MORRIS, T. W.; WALLACE, J. C.; CRONAN, J. E. Molecular Recognition in a Post-Translational Modification of Exceptional Specificity. Mutants of the Biotinylated Domain of Acetyl-CoA Carboxylase Defective in Recognition by Biotin Protein Ligase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 3, p. 1449–1457, 1999.

CHAPMAN-SMITH, A.; TURNER, D. L.; CRONAN, J. E.; MORRIS, T. W.; WALLACE, J. C. Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. **Biochemical Journal**, v. 302, n. Pt 3, p. 881–887, 1994.

CHELLAMUTHU, V. R.; ALVA, V.; FORCHHAMMER, K. From Cyanobacteria to Plants: Conservation of PII Functions during Plastid Evolution. **Planta**, v. 237, n. 2, p. 451–462, 2012.

CHELLAMUTHU, V.-R.; ERMILOVA, E.; LAPINA, T.; LÜDDECKE, J.; MINAEVA, E.; HERRMANN, C.; HARTMANN, M. D.; FORCHHAMMER, K. A Widespread Glutamine-Sensing Mechanism in the Plant Kingdom. **Cell**, v. 159, n. 5, p. 1188–1199, 2014.

CHEN, S.; DU, J.; WU, L.; ZHAO, Y.; LI, J. Interaction between PII and NifA in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Chinese Science Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 170–174, 2003.

CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, C.; LI, J.-L. Functional Analysis of the GAF Domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: Effects of Tyr→Phe Mutations on NifA and Its Interaction with GlnB. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 273, n. 5, p. 415–422, 2005.

CHOI-RHEE, E.; CRONAN, J. E. The Biotin Carboxylase-Biotin Carboxyl Carrier Protein Complex of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 30806–30812, 2003.

CHOU, C.-Y.; YU, L. P. C.; TONG, L. Crystal Structure of Biotin Carboxylase in Complex with Substrates and Implications for Its Catalytic Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 17, p. 11690–11697, 2009.

COHEN, G. N. Microbial biochemistry. [s.l.] Springer, 2014.

COLE, S. T.; BROSC, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M.-A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the Complete Genome Sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.

COMMICHAU, F. M.; FORCHHAMMER, K.; STÜLKE, J. Regulatory Links between Carbon and Nitrogen Metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 167–172, 2006.

COUTO, G.H. Expressão e purificação da proteína GlnD de *Herbaspirillum seropedicae*. Curitiba, 2005. 112 f. Dissertação (Mestrado – Ciências Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized P.p.b.-Range Mass Accuracies and Proteome-Wide Protein Quantification. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367–1372, 2008.

COX, J.; NEUHAUSER, N.; MICHALSKI, A.; SCHELTEMA, R. A.; OLSEN, J. V.; MANN, M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1794–1805, 2011.

CRONAN, J. E. Biotination of Proteins in Vivo. A Post-Translational Modification to Label, Purify, and Study Proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 18, p. 10327–10333, 1990.

CRONAN, J. E. The Biotinyl Domain of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase Evidence that the “Thumb” Structure is Essential and that the Domain Functions as a Dimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 40, p. 37355–37364, 2001.

CRONAN, J. E.; THOMAS, J. Bacterial Fatty Acid Synthesis and its Relationships with Polyketide Synthetic Pathways. **Methods in enzymology**, v. 459, p. 395–433, 2009.

CRONAN JR., J. E.; WALDROP, G. L. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 5, p. 407–435, 2002.

DANIEL, J.; OH, T.-J.; LEE, C.-M.; KOLATTUKUDY, P. E. AccD6, a Member of the Fas II Locus, Is a Functional Carboxyltransferase Subunit of the Acyl-Coenzyme A Carboxylase in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 911–917, f2007.

DA ROCHA, R. A.; WESCHENFELDER, T. A.; DE CASTILHOS, F.; DE SOUZA, E. M.; HUERGO, L. F.; MITCHELL, D. A. Mathematical Model of the Binding of Allosteric Effectors to the *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein GlnB. **Biochemistry**, v. 52, n. 15, p. 2683–2693, 2013.

DAVIS, M. S.; CRONAN, J. E. Inhibition of *Escherichia coli* Acetyl Coenzyme A Carboxylase by Acyl-Acyl Carrier Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1499–1503, 2001.

DE INGENIIS, J.; KAZANOV, M. D.; SHATALIN, K.; GELFAND, M. S.; OSTERMAN, A. L.; SORCI, L. Glutamine versus Ammonia Utilization in the NAD Synthetase Family. **PloS One**, v. 7, n. 6, p. e39115, 2012.

DEUTSCHER, J.; FRANCKE, C.; POSTMA, P. W. How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 4, p. 939–1031, 2006.

DEUTSCHER, M. P. Degradation of RNA in Bacteria: Comparison of mRNA and Stable RNA. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 2, p. 659–666, 2006.

DE ZAMAROCZY, M. Structural Homologues P(II) and P(Z) of *Azospirillum brasilense* Provide Intracellular Signalling for Selective Regulation of Various Nitrogen-Dependent Functions. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 449–463, 1998.

DE ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of Three Different Nitrogen-Regulated Promoter Regions for the Expression of glnB and glnA in *Azospirillum brasilense*. **Molecular & general genetics: MGG**, v. 224, n. 3, p. 421–430, 1990.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional Organization of the glnB-glnA Cluster of *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 9, p. 2507–2515, 1993.

DE ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of Two Structurally Similar but Functionally Different PII Proteins in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4143–4149, 1996.

DIACOVICH, L.; MITCHELL, D. L.; PHAM, H.; GAGO, G.; MELGAR, M. M.; KHOSLA, C.; GRAMAJO, H.; TSAI, S.-C. Crystal Structure of the Beta-Subunit of Acyl-CoA Carboxylase: Structure-Based Engineering of Substrate Specificity. **Biochemistry**, v. 43, n. 44, p. 14027–14036, 2004.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

DOUCETTE, C. D.; SCHWAB, D. J.; WINGREEN, N. S.; RABINOWITZ, J. D. α -Ketoglutarate Coordinates Carbon and Nitrogen Utilization via Enzyme I Inhibition. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 12, p. 894–901, 2011.

EBERLY, J. O.; RINGELBERG, D. B.; INDEST, K. J. Physiological Characterization of Lipid Accumulation and in Vivo Ester Formation in *Gordonia* sp. KTR9. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 201–208, 2012.

FALL, R. R.; VAGELOS, P. R. Acetyl Coenzyme A Carboxylase Molecular Forms and Subunit Composition of Biotin Carboxyl Carrier Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 24, p. 8005–8015, 1972.

FERIA BOURRELLIER, A. B.; VALOT, B.; GUILLOT, A.; AMBARD-BRETTEVILLE, F.; VIDAL, J.; HODGES, M. Chloroplast Acetyl-CoA Carboxylase Activity Is 2-Oxoglutarate-Regulated by Interaction of PII With the Biotin Carboxyl Carrier Subunit. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 1, p. 502–507, 2010.

FERNÁNDEZ-MURGA, M. L.; RUBIO, V. Basis of Arginine Sensitivity of Microbial N-Acetyl-L-Glutamate Kinases: Mutagenesis and Protein Engineering Study with the *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Enzymes. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 3018–3025, 2008.

FERRARIO-MÉRY, S.; MEYER, C.; HODGES, M. Chloroplast Nitrite Uptake Is Enhanced in *Arabidopsis* PII Mutants. **FEBS letters**, v. 582, n. 7, p. 1061–1066, 2008.

FISCHER, J. J.; COATHAM, M. L.; BEAR, S. E.; BRANDON, H. E.; DE LAURENTIIS, E. I.; SHIELDS, M. J.; WIEDEN, H.-J. The Ribosome Modulates the Structural Dynamics of the Conserved GTPase HflX and Triggers Tight Nucleotide Binding. **Biochimie**, v. 94, n. 8, p. 1647–1659, 2012.

FOKINA, O.; CHELLAMUTHU, V.-R.; FORCHHAMMER, K.; ZETH, K. Mechanism of 2-oxoglutarate Signaling by the *Synechococcus elongatus* PII Signal Transduction Protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 46, p. 19760–19765, 2010a.

FOKINA, O.; CHELLAMUTHU, V.-R.; ZETH, K.; FORCHHAMMER, K. A Novel Signal Transduction Protein PII Variant from *Synechococcus elongatus* PCC 7942 Indicates a Two-Step Process for NAGK–PII Complex Formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 399, n. 3, p. 410–421, 2010b.

FORCHHAMMER, K. Global Carbon/nitrogen Control by PII Signal Transduction in Cyanobacteria: From Signals to Targets. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 319–333, 2004.

FORCHHAMMER, K. P(II) Signal Transducers: Novel Functional and Structural Insights. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 65–72, 2008.

GAGO, G.; DIACOVICH, L.; ARABOLAZA, A.; TSAI, S.-C.; GRAMAJO, H. Fatty Acid Biosynthesis in Actinomycetes. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 3, p. 475–497, 2011.

GAGO, G.; KURTH, D.; DIACOVICH, L.; TSAI, S.-C.; GRAMAJO, H. Biochemical and Structural Characterization of an Essential Acyl Coenzyme A Carboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 477–486, 2006.

GALPERIN, M. Y.; GRISHIN, N. V. The Synthetase Domains of Cobalamin Biosynthesis Amidotransferases *cobB* and *cobQ* Belong to a New Family of ATP-Dependent Amidoligases, Related to Dethiobiotin Synthetase. **Proteins**, v. 41, n. 2, p. 238–247, 2000.

GALPERIN, M. Y.; KOONIN, E. V. A Diverse Superfamily of Enzymes with ATP-Dependent Carboxylate—amine/thiol Ligase Activity. **Protein Science**, v. 6, n. 12, p. 2639–2643, 1997.

GEIGER, T.; WEHNER, A.; SCHAAB, C.; COX, J.; MANN, M. Comparative Proteomic Analysis of Eleven Common Cell Lines Reveals Ubiquitous but Varying Expression of Most Proteins. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 11, n. 3, p. M111.014050, 2012.

GERHARDT, E.C.M. Regulação pós-traducional da enzima nitrogenase em *Azospirillum brasilense*. Curitiba, 2012. 129 f. Dissertação (Mestrado – Ciências Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GERHARDT, E. C. M.; ARAÚJO, L. M.; RIBEIRO, R. R.; CHUBATSU, L. S.; SCARDUELLI, M.; RODRIGUES, T. E.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; HUERGO, L. F. Influence of the ADP/ATP Ratio, 2-Oxoglutarate and Divalent Ions on *Azospirillum brasilense* PII Protein Signalling. **Microbiology (Reading, England)**, v. 158, n. Pt 6, p. 1656–1663, 2012.

GERHARDT, E. C. M.; RODRIGUES, T. E.; MÜLLER-SANTOS, M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; FORCHHAMMER, K.; HUERGO, L. F. The Bacterial Signal Transduction Protein GlnB Regulates the Committed Step in Fatty Acid Biosynthesis by Acting as a Dissociable Regulatory Subunit of Acetyl-CoA Carboxylase. **Molecular Microbiology**, v. 95, n. 6, p. 1025–1035, 2015.

GIBSON, D. G.; YOUNG, L.; CHUANG, R.-Y.; VENTER, J. C.; HUTCHISON, C. A.; SMITH, H. O. Enzymatic Assembly of DNA Molecules up to Several Hundred Kilobases. **Nature Methods**, v. 6, n. 5, p. 343–345, 2009.

GIL-ORTIZ, F.; RAMÓN-MAIQUES, S.; FERNÁNDEZ-MURGA, M. L.; FITA, I.; RUBIO, V. Two Crystal Structures of *Escherichia coli* N-Acetyl-L-Glutamate Kinase Demonstrate the Cycling between Open and Closed Conformations. **Journal of Molecular Biology**, v. 399, n. 3, p. 476–490, 11 j10.

GLANSDORFF, N.; CHARLIER, D. Biosynthesis of Arginine and Polyamines. **EcoSal Plus**, v. 1, n. 3, 3 dez. 2013.

GREGOLIN, C.; RYDER, E.; KLEINSCHMIDT, A. K.; WARNER, R. C.; LANE, M. D. Molecular characteristics of liver acetyl CoA carboxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 56, n. 1, p. 148–155, jul. 1966.

GRUSWITZ, F.; O'CONNELL, J.; STROUD, R. M. Inhibitory Complex of the Transmembrane Ammonia Channel, AmtB, and the Cytosolic Regulatory Protein, GlnK, at 1.96 Å. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 1, p. 42–47, 2007.

HARDIE, D. G.; PAN, D. A. Regulation of Fatty Acid Synthesis and Oxidation by the AMP-Activated Protein Kinase. **Biochemical Society Transactions**, v. 30, n. Pt 6, p. 1064–1070, 2002.

HASELTINE, W. A.; BLOCK, R. Synthesis of Guanosine Tetra- and Pentaphosphate Requires the Presence of a Codon-Specific, Uncharged Transfer Ribonucleic Acid in the Acceptor Site of Ribosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 5, p. 1564–1568, 1973.

HAURYLIUK, V.; ATKINSON, G. C.; MURAKAMI, K. S.; TENSON, T.; GERDES, K. Recent Functional Insights into the Role of (p)ppGpp in Bacterial Physiology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 298–309, 2015.

HEINRICH, A.; MAHESWARAN, M.; RUPPERT, U.; FORCHHAMMER, K. The *Synechococcus elongatus* PII Signal Transduction Protein Controls Arginine Synthesis by Complex Formation with N-Acetyl-L-Glutamate Kinase. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1303–1314, 2004.

HEINRICH, A.; WOYDA, K.; BRAUBURGER, K.; MEISS, G.; DETSCH, C.; STÜLKE, J.; FORCHHAMMER, K. Interaction of the Membrane-Bound GlnK-AmtB Complex with the Master Regulator of Nitrogen Metabolism TnrA in *Bacillus subtilis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 34909–34917, 2006.

HELFMANN, S.; LÜ, W.; LITZ, C.; ANDRADE, S. L. A. Cooperative Binding of MgATP and MgADP in the Trimeric P(II) Protein GlnK2 from *Archaeoglobus fulgidus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, n. 1, p. 165–177, 2010.

HOPWOOD, D. A.; SHERMAN, D. H. Molecular Genetics of Polyketides and its Comparison to Fatty Acid Biosynthesis. **Annual Review of Genetics**, v. 24, n. 1, p. 37–62, 1990.

HOU, J.; XIANG, H.; HAN, J. Propionyl Coenzyme A (Propionyl-CoA) Carboxylase in *Haloferax mediterranei*: Indispensability for Propionyl-CoA Assimilation and Impacts on Global Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 794–804, 2015.

HOWARTH, M.; TAKAO, K.; HAYASHI, Y.; TING, A. Y. Targeting Quantum Dots to Surface Proteins in Living Cells with Biotin Ligase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 21, p. 7583–7588, 2005.

HUERGO, L. F.; CHANDRA, G.; MERRICK, M. PII Signal Transduction Proteins: Nitrogen Regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 251–283, 2013.

HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STEFFENS, M. B. R.; MERRICK, M. Interactions between PII Proteins and the Nitrogenase Regulatory Enzymes DraT and DraG in *Azospirillum brasilense*. **FEBS letters**, v. 580, n. 22, p. 5232–5236, 2006a.

HUERGO, L. F.; DIXON, R. The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 79, n. 4, p. 419–435, 2015.

HUERGO, L. F.; MERRICK, M.; MONTEIRO, R. A.; CHUBATSU, L. S.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. In Vitro Interactions between the PII Proteins and the Nitrogenase Regulatory Enzymes Dinitrogenase Reductase ADP-Ribosyltransferase (DraT)

and Dinitrogenase Reductase-Activating Glycohydrolase (DraG) in *Azospirillum brasilense*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 11, p. 6674–6682, 2009.

HUERGO, L. F.; MERRICK, M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; ARAUJO, L. M.; SOUZA, E. M. Ternary Complex Formation between AmtB, GlnZ and the Nitrogenase Regulatory Enzyme DraG Reveals a Novel Facet of Nitrogen Regulation in Bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 1523–1535, 2007.

HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O.; MULLER-SANTOS, M.; CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; MERRICK, M.; SOUZA, E. M. PII Signal Transduction Proteins: Pivotal Players in Post-Translational Control of Nitrogenase Activity. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 176–190, 2012.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; ARAUJO, M. S.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; STEFFENS, M. B. R.; MERRICK, M. ADP-Ribosylation of Dinitrogenase Reductase in *Azospirillum brasilense* Is Regulated by AmtB-Dependent Membrane Sequestration of DraG. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 326–337, 2006b.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Regulation of glnB Gene Promoter Expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC Protein. **FEMS microbiology letters**, v. 223, n. 1, p. 33–40, 6 2003.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Effects of over-Expression of the Regulatory Enzymes DraT and DraG on the Ammonium-Dependent Post-Translational Regulation of Nitrogenase Reductase in *Azospirillum brasilense*. **Archives of Microbiology**, v. 183, n. 3, p. 209–217, 2005.

HÜGLER, M.; KRIEGER, R. S.; JAHN, M.; FUCHS, G. Characterization of Acetyl-CoA/propionyl-CoA Carboxylase in *Metallosphaera sedula*. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 4, p. 736–744, 2003.

IOBBI-NIVOL, C.; LEIMKÜHLER, S. Molybdenum Enzymes, Their Maturation and Molybdenum Cofactor Biosynthesis in *Escherichia coli*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1827, n. 8-9, p. 1086–1101, 2013.

JAHN, S.; HAVERKORN VAN RIJSEWIJK, B. R.; SAUER, U.; BETTENBROCK, K. A role for EliANtr in controlling fluxes in the central metabolism of *E. coli* K12. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 2879–2889, 2013.

JAIN, N.; DHIMOLE, N.; KHAN, A. R.; DE, D.; TOMAR, S. K.; SAJISH, M.; DUTTA, D.; PARRACK, P.; PRAKASH, B. *E. coli* HflX Interacts with 50S Ribosomal Subunits in Presence of Nucleotides. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, n. 2, p. 201–205, 2009.

JAIN, S.; MANDAL, R. S.; ANAND, S.; MAITI, S.; RAMACHANDRAN, S. Probing the Amino Acids Critical for Protein Oligomerisation and Protein-Nucleotide Interaction in *Mycobacterium tuberculosis* PII Protein through Integration of Computational and Experimental Approaches. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1834, n. 12, p. 2736–2749, 2013.

JAMES, E. S.; CRONAN, J. E. Expression of Two *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase Subunits Is Autoregulated. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 4, p. 2520–2527, 2004.

JANIYANI, K.; BORDELON, T.; WALDROP, G. L.; CRONAN, J. E. Function of *Escherichia coli* Biotin Carboxylase Requires Catalytic Activity of Both Subunits of the Homodimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 32, p. 29864–29870, 2001.

JAVELLE, A.; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium Sensing in *Escherichia coli*. Role of the Ammonium Transporter AmtB and AmtB-GlnK Complex Formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8530–8538, 2004.

JENAL, U.; MALONE, J. Mechanisms of Cyclic-di-GMP Signaling in Bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 40, n. 1, p. 385–407, 2006.

JIANG, P.; NINFA, A. J. *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Controlling Nitrogen Assimilation Acts As a Sensor of Adenylate Energy Charge in Vitro†. **Biochemistry**, v. 46, n. 45, p. 12979–12996, 2007.

JIANG, P.; NINFA, A. J. Reconstitution of *Escherichia coli* Glutamine Synthetase Adenylyltransferase from N-Terminal and C-Terminal Fragments of the Enzyme. **Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 415–423, 2009.

JIANG, P.; PELISKA, J. A.; NINFA, A. J. Enzymological Characterization of the Signal-Transducing Uridylyltransferase/uridylyl-Removing Enzyme (EC 2.7.7.59) of *Escherichia coli* and Its Interaction with the PII Protein. **Biochemistry**, v. 37, n. 37, p. 12782–12794, 1998.

JONSSON, A.; TEIXEIRA, P. F.; NORDLUND, S. The Activity of Adenylyltransferase in *Rhodospirillum rubrum* Is Only Affected by α -Ketoglutarate and Unmodified PII Proteins, but Not by Glutamine, in Vitro. **FEBS Journal**, v. 274, n. 10, p. 2449–2460, 2007.

KADDOR, C.; STEINBÜCHEL, A. Effects of Homologous Phosphoenolpyruvate-Carbohydrate Phosphotransferase System Proteins on Carbohydrate Uptake and poly(3-Hydroxybutyrate) Accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3582–3590, 2011.

KADOURI, D.; JURKEVITCH, E.; OKON, Y. Involvement of the Reserve Material Poly-Beta-Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3244–3250, 2003.

KAMBEROV, E. S.; ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. The *Escherichia coli* PII Signal Transduction Protein Is Activated upon Binding 2-Ketoglutarate and ATP. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 30, p. 17797–17807, 1995.

KARSTENS, K.; ZSCHIEDRICH, C. P.; BOWIEN, B.; STULKE, J.; GORKE, B. Phosphotransferase Protein EliANtr Interacts with SpoT, a Key Enzyme of the Stringent Response, in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 160, n. Pt_4, p. 711–722, 2014.

KIM, C.-W.; MOON, Y.-A.; PARK, S. W.; CHENG, D.; KWON, H. J.; HORTON, J. D. Induced Polymerization of Mammalian Acetyl-CoA Carboxylase by MIG12 Provides a Tertiary Level of Regulation of Fatty Acid Synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 21, p. 9626–9631, 2010.

KIMURA, Y.; MIYAKE, R.; TOKUMASU, Y.; SATO, M. Molecular Cloning and Characterization of Two Genes for the Biotin Carboxylase and Carboxyltransferase Subunits of Acetyl Coenzyme A Carboxylase in *Myxococcus xanthus*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 19, p. 5462–5469, 2000.

KLASSEN, G.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; COSTA, R. M.; INABA, J.; PEDROSA, F. O. Nitrogenase Switch-off by Ammonium Ions in *Azospirillum brasilense* Requires the GlnB Nitrogen Signal-Transducing Protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5637–5641, set. 2005.

KOLATTUKUDY, P. E.; FERNANDES, N. D.; AZAD, A. K.; FITZMAURICE, A. M.; SIRAKOVA, T. D. Biochemistry and Molecular Genetics of Cell-Wall Lipid Biosynthesis in *Mycobacteria*. **Molecular Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 263–270, 1 abr. 1997.

KURIHARA, S.; ODA, S.; TSUBOI, Y.; KIM, H. G.; OSHIDA, M.; KUMAGAI, H.; SUZUKI, H. γ -Glutamylputrescine Synthetase in the Putrescine Utilization Pathway of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 29, p. 19981–19990, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LLÁCER, J.L.; CONTRERAS, A.; FORCHHAMMER, K.; MARCO-MARÍN, C.; GIL-ORTIZ, F.; MALDONADO, R.; FITA, I.; RUBIO, V. The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, n. 45, p. 17644–17649, 2007.

LEE, C.-K.; CHEONG, H.-K.; RYU, K.-S.; LEE, J. I.; LEE, W.; JEON, Y. H.; CHEONG, C. Biotinoyl Domain of Human Acetyl-CoA Carboxylase: Structural Insights into the Carboxyl Transfer Mechanism. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 72, n. 2, p. 613–624, 2008.

LEE, C.-R.; CHO, S.-H.; YOON, M.-J.; PETERKOFISKY, A.; SEOK, Y.-J. *Escherichia coli* enzyme IANtr regulates the K⁺ transporter TrkA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 10, p. 4124–4129, 2007.

LEE, C.-R.; PARK, Y.-H.; KIM, M.; KIM, Y.-R.; PARK, S.; PETERKOFISKY, A.; SEOK, Y.-J. Reciprocal Regulation of the Autophosphorylation of Enzyme INtr by Glutamine and α -Ketoglutarate in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 473–485, 2013.

LEE, J.; SPERANDIO, V.; FRANTZ, D. E.; LONGGOOD, J.; CAMILLI, A.; PHILLIPS, M. A.; MICHAEL, A. J. An Alternative Polyamine Biosynthetic Pathway Is Widespread in Bacteria and Essential for Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 15, p. 9899–9907, 2009.

LEIGH, J. A.; DODSWORTH, J. A. Nitrogen Regulation in Bacteria and Archaea. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 349–377, 2007.

LENNEN, R. M.; PFLEGER, B. F. Engineering *Escherichia coli* to synthesize free fatty acids. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 12, 2012.

LENNEN, R. M.; PFLEGER, B. F. Microbial production of fatty acid-derived fuels and chemicals. **Current opinion in biotechnology**, v. 24, n. 6, 2013.

LEONARDI, R.; FAIRHURST, S. A.; KRIEK, M.; LOWE, D. J.; ROACH, P. L. Thiamine Biosynthesis in *Escherichia coli*: Isolation and Initial Characterisation of the ThiGH Complex. **FEBS letters**, v. 539, n. 1–3, p. 95–99, 2003.

- LI, S. J.; CRONAN, J. E. The Gene Encoding the Biotin Carboxylase Subunit of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 2, p. 855–863, 1992.
- LI, S. J.; CRONAN, J. E. Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 2, p. 332–340, 1993.
- LLÁCER, J. L.; FITA, I.; RUBIO, V. Arginine and nitrogen storage. **Current Opinion in Structural Biology**, Catalysis and regulation / Proteins. v. 18, n. 6, p. 673–681, 2008.
- LOMBARD, J.; MOREIRA, D. Early evolution of the biotin-dependent carboxylase family. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 232, 2011.
- LUBER, C. A.; COX, J.; LAUTERBACH, H.; FANCKE, B.; SELBACH, M.; TSCHOPP, J.; AKIRA, S.; WIEGAND, M.; HOCHREIN, H.; O'KEEFFE, M.; MANN, M. Quantitative Proteomics Reveals Subset-Specific Viral Recognition in Dendritic Cells. **Immunity**, v. 32, n. 2, p. 279–289, 2010.
- LÜDDECKE, J.; FORCHHAMMER, K. Energy Sensing versus 2-Oxoglutarate Dependent ATPase Switch in the Control of *Synechococcus* PII Interaction with Its Targets NAGK and PipX. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0137114, 2015.
- LÜTTMANN, D.; GÖPEL, Y.; GÖRKE, B. The Phosphotransferase Protein EliANtr Modulates the Phosphate Starvation Response through Interaction with Histidine Kinase PhoR in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 96–110, 2012.
- LÜTTMANN, D.; HEERMANN, R.; ZIMMER, B.; HILLMANN, A.; RAMPP, I. S.; JUNG, K.; GÖRKE, B. Stimulation of the Potassium Sensor KdpD Kinase Activity by Interaction with the Phosphotransferase Protein IIA(Ntr) in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 978–994, 2009.
- MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549–553, 1991.
- MAHESWARAN, M.; URBANKE, C.; FORCHHAMMER, K. Complex Formation and Catalytic Activation by the PII Signaling Protein of N-Acetyl-L-Glutamate Kinase from *Synechococcus elongatus* Strain PCC 7942. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55202–55210, 2004.
- MAHESWARAN, M.; ZIEGLER, K.; LOCKAU, W.; HAGEMANN, M.; FORCHHAMMER, K. PII-Regulated Arginine Synthesis Controls Accumulation of Cyanophycin in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 7, p. 2730–2734, 2006.
- MARTIN, G. J. O.; HILL, D. R. A.; OLMSTEAD, I. L. D.; BERGAMIN, A.; SHEARS, M. J.; DIAS, D. A.; KENTISH, S. E.; SCALES, P. J.; BOTTÉ, C. Y.; CALLAHAN, D. L. Lipid Profile Remodeling in Response to Nitrogen Deprivation in the Microalgae *Chlorella* Sp. (Trebouxiophyceae) and *Nannochloropsis* Sp. (Eustigmatophyceae). **PloS One**, v. 9, n. 8, p. e103389, 2014.
- MEADES, G.; BENSON, B. K.; GROVE, A.; WALDROP, G. L. A tale of two functions: enzymatic activity and translational repression by carboxyltransferase. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 4, p. 1217–1227, 2010.

MENG, X.; YANG, J.; CAO, Y.; LI, L.; JIANG, X.; XU, X.; LIU, W.; XIAN, M.; ZHANG, Y. Increasing Fatty Acid Production in *E. coli* by Simulating the Lipid Accumulation of Oleaginous Microorganisms. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 919–925, 2010.

MERRICK, M. Post-translational modification of PII signal transduction proteins. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 6 jan. 2015.

MIYAKE, M.; KATAOKA, K.; SHIRAI, M.; ASADA, Y. Control of Poly-Beta-Hydroxybutyrate Synthase Mediated by Acetyl Phosphate in Cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 16, p. 5009–5013, 1997.

MIYAKE, M.; TAKASE, K.; NARATO, M.; KHATIPOV, E.; SCHNACKENBERG, J.; SHIRAI, M.; KURANE, R.; ASADA, Y. Polyhydroxybutyrate Production from Carbon Dioxide by Cyanobacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1-9, p. 991–1002, 2000.

MOONEY, R. A.; DAVIS, S. E.; PETERS, J. M.; ROWLAND, J. L.; ANSARI, A. Z.; LANDICK, R. Regulator trafficking on bacterial transcription units in vivo. **Molecular cell**, v. 33, n. 1, p. 97–108, 2009.

MOURE, V. R.; DANYAL, K.; YANG, Z.-Y.; WENDROTH, S.; MÜLLER-SANTOS, M.; PEDROSA, F. O.; SCARDUELLI, M.; GERHARDT, E. C. M.; HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; SEEFELDT, L. C. The Nitrogenase Regulatory Enzyme Dinitrogenase Reductase ADP-Ribosyltransferase (DraT) Is Activated by Direct Interaction with the Signal Transduction Protein GlnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279–286, 2013.

MOURE, V. R.; RAZZERA, G.; ARAÚJO, L. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; GERHARDT, E. C. M.; MÜLLER-SANTOS, M.; ALMEIDA, F.; PEDROSA, F. O.; VALENTE, A. P.; SOUZA, E. M.; HUERGO, L. F. Heat Stability of Proteobacterial PII Protein Facilitate Purification Using a Single Chromatography Step. **Protein Expression and Purification**, v. 81, n. 1, p. 83–88, 2012.

MÜLLER-SANTOS, M.; SOUZA, E. M. de; PEDROSA, F. de O.; CHUBATSU, L. S. Polyhydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (Ed.). **Handbook for Azospirillum**. [s.l.] Springer International Publishing, 2015. p. 241–250.

NENORTAS, E.; BECKETT, D. Purification and Characterization of Intact and Truncated Forms of the *Escherichia coli* Biotin Carboxyl Carrier Subunit of Acetyl-CoA Carboxylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 13, p. 7559–7567, 1996.

NIKOLAU, B. J.; OHLROGGE, J. B.; WURTELE, E. S. Plant Biotin-Containing Carboxylases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 414, n. 2, p. 211–222, 2003.

NINFA, A. J.; JIANG, P. PII Signal Transduction Proteins: Sensors of Alpha-Ketoglutarate That Regulate Nitrogen Metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 168–173, 2005.

NOLDEN, L.; NGOUOTO-NKILI, C. E.; BENDT, A. K.; KRÄMER, R.; BURKOVSKI, A. Sensing Nitrogen Limitation in *Corynebacterium glutamicum*: The Role of glnK and glnD. **Molecular Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1281–1295, 2001.

OHASHI, Y.; SHI, W.; TAKATANI, N.; AICHI, M.; MAEDA, S.; WATANABE, S.; YOSHIKAWA, H.; OMATA, T. Regulation of Nitrate Assimilation in Cyanobacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1411–1424, 2011.

OLUKOSHI, E. R.; PACKTER, N. M. Importance of Stored Triacylglycerols in *Streptomyces*: Possible Carbon Source for Antibiotics. **Microbiology**, v. 140, n. 4, p. 931–943, 1994.

OSANAI, T.; SATO, S.; TABATA, S.; TANAKA, K. Identification of PamA as a PII-Binding Membrane Protein Important in Nitrogen-Related and Sugar-Catabolic Gene Expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 41, p. 34684–34690, 2005.

PANKIEVICZ, V. C. S.; DO AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D. N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M. J.; ARISI, A. C. M.; STEFFENS, M. B. R.; DE SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; STACEY, G.; FERRIERI, R. A. Robust Biological Nitrogen Fixation in a Model Grass-Bacterial Association. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, v. 81, n. 6, p. 907–919, 2015.

PAWLOWSKI, A.; RIEDEL, K.-U.; KLIPP, W.; DREISKEMPER, P.; GROSS, S.; BIERHOFF, H.; DREPPER, T.; MASEPOHL, B. Yeast Two-Hybrid Studies on Interaction of Proteins Involved in Regulation of Nitrogen Fixation in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 17, p. 5240–5247, 2003.

PEDROSA, F. O. Fixação biológica de nitrogênio: fértil idéia. **Ciência Hoje**, v. 6, p. 12–13, 1987.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of *Azospirillum brasilense* by nifA and ntr (gln) type gene products (*Azospirillum brasilense*; Nif- mutants; nifA; ntrC; MoFe protein). **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, p. 95–101, 1984.

PFLÜGER-GRAU, K.; CHAVARRÍA, M.; DE LORENZO, V. The Interplay of the EIIA(Ntr) Component of the Nitrogen-Related Phosphotransferase System (PTS(Ntr)) of *Pseudomonas putida* with Pyruvate Dehydrogenase. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1810, n. 10, p. 995–1005, 2011.

PFLÜGER-GRAU, K.; GÖRKE, B. Regulatory Roles of the Bacterial Nitrogen-Related Phosphotransferase System. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 205–214, 2010.

PODKOWIŃSKI, J.; TWORAK, A. OPINIONS Acetyl-coenzyme A carboxylase – an attractive enzyme for biotechnology. **BioTechnologia**, v. 4, p. 321–335, 2011.

RADCHENKO, M. V.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Control of AmtB-GlnK Complex Formation by Intracellular Levels of ATP, ADP, and 2-Oxoglutarate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 40, p. 31037–31045, 2010.

RADCHENKO, M. V.; THORNTON, J.; MERRICK, M. P(II) Signal Transduction Proteins Are ATPases Whose Activity Is Regulated by 2-Oxoglutarate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 32, p. 12948–12953, 2013.

RAMÓN-MAIQUES, S.; FERNÁNDEZ-MURGA, M. L.; GIL-ORTIZ, F.; VAGIN, A.; FITA, I.; RUBIO, V. Structural Bases of Feed-back Control of Arginine Biosynthesis, Revealed by the Structures of Two Hexameric N-Acetylglutamate Kinases, from *Thermotoga maritima* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Molecular Biology**, v. 356, n. 3, p. 695–713, 2006.

- RATTI, S.; CURTI, B.; ZANETTI, G.; GALLI, E. Purification and characterization of glutamate synthase from *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 2, p. 724–729, 1985.
- RODRIGUES, T. E.; GERHARDT, E. C. M.; OLIVEIRA, M. A.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; SOUZA, G. A.; MÜLLER-SANTOS, M.; HUERGO, L. F. Search for Novel Targets of the PII Signal Transduction Protein in Bacteria Identifies the BCCP Component of Acetyl-CoA Carboxylase as a PII Binding Partner. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 751–761, 2014.
- RODRIGUES, T. E.; SOUZA, V. E. P.; MONTEIRO, R. A.; GERHARDT, E. C. M.; ARAÚJO, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; HUERGO, L. F. In Vitro Interaction between the Ammonium Transport Protein AmtB and Partially Uridylylated Forms of the P(II) Protein GlnZ. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1814, n. 9, p. 1203–1209, 2011.
- RODRÍGUEZ, E.; BANCHIO, C.; DIACOVICH, L.; BIBB, M. J.; GRAMAJO, H. Role of an Essential Acyl Coenzyme A Carboxylase in the Primary and Secondary Metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4166–4176, 2001.
- RODRIGUEZ, E.; NAVONE, L.; CASATI, P.; GRAMAJO, H. Impact of Malic Enzymes on Antibiotic and Triacylglycerol Production in *Streptomyces coelicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 13, p. 4571–4579, 2012.
- RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 77, n. 1, p. 1–52, 2013.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, n. 2, 1989.
- SARKAR, A.; KÖHLER, J.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. A Novel Regulatory Role of the Rnf Complex of *Azoarcus* Sp. Strain BH72. **Molecular Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 408–422, 2012.
- SCHMIDT, M. C.; CHAMBERLIN, M. J. Binding of Rho Factor to *Escherichia coli* RNA Polymerase Mediated by nusA Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 24, p. 15000–15002, 1984.
- SCHNEIDER, D. A.; GOURSE, R. L. Relationship between Growth Rate and ATP Concentration in *Escherichia coli* A Bioassay For Available Cellular ATP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 9, p. 8262–8268, 2004.
- SCHUMACHER, M. A.; CHINNAM, N. B.; CUTHBERT, B.; TONTHAT, N. K.; WHITFILL, T. Structures of Regulatory Machinery Reveal Novel Molecular Mechanisms Controlling *B. subtilis* Nitrogen Homeostasis. **Genes & Development**, v. 29, n. 4, p. 451–464, 2015.
- SEGURA, D.; ESPÍN, G. Mutational Inactivation of a Gene Homologous to *Escherichia coli* ptsP Affects Poly- β -Hydroxybutyrate Accumulation and Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4790–4798, 1998.

SHEPPARD, K.; YUAN, J.; HOHN, M. J.; JESTER, B.; DEVINE, K. M.; SÖLL, D. From One Amino Acid to Another: tRNA-Dependent Amino Acid Biosynthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 6, p. 1813–1825, 2008.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.

WAKIL S J; STOOPS J K; JOSHI, V. C. Fatty Acid Synthesis and its Regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, n. 1, p. 537–579, 1983.

SMITH, A. C.; CRONAN, J. E. Evidence against Translational Repression by the Carboxyltransferase Component of *Escherichia coli* Acetyl Coenzyme A Carboxylase. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 21, p. 3768–3775, 2014.

SMITH, C. S.; WELJIE, A. M.; MOORHEAD, G. B. G. Molecular Properties of the Putative Nitrogen Sensor PII from *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 33, n. 2, p. 353–360, 2003.

SOLBIATI, J.; CHAPMAN-SMITH, A.; CRONAN, J. E. Stabilization of the Biotinoyl Domain of *Escherichia coli* Acetyl-CoA Carboxylase by Interactions between the Attached Biotin and the Protruding “Thumb” Structure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21604–21609, 2002.

SON, H. S.; RHEE, S. G. Cascade Control of *Escherichia coli* Glutamine Synthetase. Purification and Properties of PII Protein and Nucleotide Sequence of Its Structural Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p. 8690–8695, 1987.

SORIANO, A.; RADICE, A. D.; HERBITTER, A. H.; LANGSDORF, E. F.; STAFFORD, J. M.; CHAN, S.; WANG, S.; LIU, Y.-H.; BLACK, T. A. *Escherichia coli* acetyl-coenzyme A carboxylase: Characterization and development of a high-throughput assay. **Analytical Biochemistry**, v. 349, n. 2, p. 268–276, 2006.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a Free-Living Nitrogen-Fixing Bacterium Closely Associated with Grasses: Genetic, Biochemical and Ecological Aspects. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 487–506, 2000.

STEINHAUSER, D.; FERNIE, A. R.; ARAÚJO, W. L. Unusual Cyanobacterial TCA Cycles: Not Broken Just Different. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 9, p. 503–509, 2012.

TRUAN, D.; BJELIĆ, S.; LI, X.-D.; WINKLER, F. K. Structure and Thermodynamics of Effector Molecule Binding to the Nitrogen Signal Transduction PII Protein GlnZ from *Azospirillum brasilense*. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 15, p. 2783–2799, 2014.

TRUAN, D.; HUERGO, L. F.; CHUBATSU, L. S.; MERRICK, M.; LI, X.-D.; WINKLER, F. K. A New P(II) Protein Structure Identifies the 2-Oxoglutarate Binding Site. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 531–539, 2010.

TURNBOUGH, C. L.; SWITZER, R. L. Regulation of Pyrimidine Biosynthetic Gene Expression in Bacteria: Repression without Repressors. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 72, n. 2, p. 266–300, 2008.

VAN DOMMELEN, A.; KEIJERS, V.; SOMERS, E.; VANDERLEYDEN, J. Cloning and Characterisation of the *Azospirillum brasilense* glnD Gene and Analysis of a glnD Mutant. **Molecular genetics and genomics: MGG**, v. 266, n. 5, p. 813–820, 2002.

VAN HEESWIJK, W. C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KAHN, D.; WESTERHOFF, H. V. An Alternative PII Protein in the Regulation of Glutamine Synthetase in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 133–146, 1996.

VAN MONTFORT, R. L.; DIJKSTRA, B. W. The functional importance of structural differences between the mannitol-specific IIA_{mannitol} and the regulatory IIA_{nitrogen}. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 7, n. 10, p. 2210–2216, 1998.

VELÁZQUEZ, F.; PFLÜGER, K.; CASES, I.; DE EUGENIO, L. I.; DE LORENZO, V. The Phosphotransferase System Formed by PtsP, PtsO, and PtsN Proteins Controls Production of Polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 12, p. 4529–4533, 2007.

VENDITTI, V.; GHIRLANDO, R.; CLORE, G. M. Structural basis for enzyme I inhibition by α -ketoglutarate. **ACS chemical biology**, v. 8, n. 6, p. 1232–1240, 2013.

WALDROP, G. L.; RAYMENT, I.; HOLDEN, H. M. Three-Dimensional Structure of the Biotin Carboxylase Subunit of Acetyl-CoA Carboxylase. **Biochemistry**, v. 33, n. 34, p. 10249–10256, 1994.

WANG, L. K.; IVANOV, V.; TAY, J.-H.; HUNG, Y.-T. **Environmental biotechnology**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2010.

WHITE, S. W.; ZHENG, J.; ZHANG, Y.-M.; ROCK, C. O. The Structural Biology of Type II Fatty Acid Biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 791–831, 2005.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; BORZIAK, K.; KHALSA-MOYERS, G.; ALEXANDRE, G.; SUKHARNIKOV, L. O.; WUICHET, K.; HURST, G. B.; MCDONALD, W. H.; ROBERTSON, J. S.; BARBE, V.; CALTEAU, A.; ROUY, Z.; MANGENOT, S.; PRIGENT-COMBARET, C.; NORMAND, P.; BOYER, M.; SIGUIER, P.; DESSAUX, Y.; ELMERICH, C.; CONDEMINÉ, G.; KRISHNEN, G.; KENNEDY, I.; PATERSON, A. H.; GONZÁLEZ, V.; MAVINGUI, P.; ZHULIN, I. B. *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. **PLoS genetics**, v. 7, n. 12, p. e1002430, 2011.

WITTERS, L. A.; FRIEDMAN, S. A.; BACON, G. W. Microsomal Acetyl-CoA Carboxylase: Evidence for Association of Enzyme Polymer with Liver Microsomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 6, p. 3639–3643, 1981.

XU, Y.; CHEAH, E.; CARR, P. D.; VAN HEESWIJK, W. C.; WESTERHOFF, H. V.; VASUDEVAN, S. G.; OLLIS, D. L. GlnK, a PII-Homologue: Structure Reveals ATP Binding Site and Indicates How the T-Loops May Be Involved in Molecular Recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 282, n. 1, p. 149–165, 1998.

YAGINUMA, H.; KAWAI, S.; TABATA, K. V.; TOMIYAMA, K.; KAKIZUKA, A.; KOMATSUZAKI, T.; NOJI, H.; IMAMURA, H. Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. **Scientific Reports**, v. 4, 2014.

YAN, D.; LENZ, P.; HWA, T. Overcoming Fluctuation and Leakage Problems in the Quantification of Intracellular 2-Oxoglutarate Levels in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 6763–6771, 2011.

ZALUTSKAYA, Z.; KHARATYAN, N.; FORCHHAMMER, K.; ERMILOVA, E. Reduction of PII Signaling Protein Enhances Lipid Body Production in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology**, v. 240, p. 1–9, 2015.

ZETH, K.; FOKINA, O.; FORCHHAMMER, K. An Engineered PII Protein Variant That Senses a Novel Ligand: Atomic Resolution Structure of the Complex with Citrate. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v. 68, n. Pt 8, p. 901–908, 2012.

ZHANG, N.; BUCK, M. A Perspective on the Enhancer Dependent Bacterial RNA Polymerase. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 1012–1019, 2015.

ZHANG, S.; BRYANT, D. A. The Tricarboxylic Acid Cycle in Cyanobacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6062, p. 1551–1553, 2011.

ZHAO, L. F.; IWASAKI, Y.; ZHE, W.; NISHIYAMA, M.; TAGUCHI, T.; TSUGITA, M.; KAMBAYASHI, M.; HASHIMOTO, K.; TERADA, Y. Hormonal Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase Isoenzyme Gene Transcription. **Endocrine Journal**, v. 57, n. 4, p. 317–324, 2010.

ZHEKISHEVA, M.; BOUSSIBA, S.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; ZARKA, A.; COHEN, Z. Accumulation of Triacylglycerols in *Haematococcus pluvialis* Is Correlated with that of Astaxanthin Esters. **Journal of Phycology**, v. 38, p. 40–41, 2002.

ZHU, Y.; CONRAD, M. C.; ZHANG, Y.; ROBERTS, G. P. Identification of *Rhodospirillum rubrum* GlnB Variants That Are Altered in Their Ability to Interact with Different Targets in Response to Nitrogen Status Signals. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 5, p. 1866–1874, 2006.